

**Molekulare Mechanismen der Erkennung des CagA-Proteins  
als Substrat für das Cag-Typ IV-Sekretionssystem  
in *Helicobacter pylori***



**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades eines  
**Doktors der Naturwissenschaften**

der Fakultät für Biologie der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

**Isabelle Maria Pattis**

März 2007

Dissertation eingereicht am: 29. März 2007

Tag der mündlichen Prüfung: 14. September 2007

1. Gutachter: Prof. Dr. Anton Hartmann
2. Gutachter: Prof. Dr. Heinrich Jung

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-von-Pettenkofer Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München unter Leitung von PD Dr. Wolfgang Fischer und Prof. Dr. Rainer Haas im Zeitraum September 2003 bis März 2007 angefertigt.

**Teile dieser Arbeit wurden unter folgenden Titeln veröffentlicht:**

**Pattis I., Weiss E., Laugks R., Haas R., and Fischer W.** (2007) The *Helicobacter pylori* CagF protein is a type IV secretion chaperone-like molecule that binds close to the C-terminal secretion signal of the CagA effector protein. *Microbiology* 153 (9): 2897-2910

**Hohlfeld S.\*, Pattis I.\*, Püls J., Plano G.V., Haas R., and Fischer W.** (2006) A C-terminal translocation signal is necessary, but not sufficient for type IV secretion of the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Mol Microbiol* 59: 1624-1637.

\*beide Autoren haben gleichermaßen zur Publikation beigetragen

**Torruellas-Garcia J., Ferracci F., Jackson M.W., Joseph S., Pattis I., Plano L.R.W., Fischer W., Plano G.V.** (2006) Measurement of effector protein injection by type III and type IV secretion systems using a 13-residue phosphorylatable GSK tag. *Infection and Immunity* Oct; 74(10):5645-57

<b>I</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1</b>	<b>Entdeckung und Epidemiologie von <i>H. pylori</i> .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Der Magen als ökologische Nische .....</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>Pathogenese <i>H. pylori</i>-assoziierter Erkrankungen .....</b>	<b>4</b>
<b>4</b>	<b>Virulenzfaktoren von <i>H. pylori</i> .....</b>	<b>6</b>
<b>5</b>	<b>Die <i>cag</i>-Pathogenitätsinsel und das CagA-Protein.....</b>	<b>7</b>
<b>6</b>	<b>Erkennung und Translokation von Effektorproteinen.....</b>	<b>11</b>
6.1	Typ III-Sekretionssysteme .....	12
6.2	Typ IV-Sekretionssysteme .....	14
<b>7</b>	<b>Ziele dieser Arbeit .....</b>	<b>16</b>
<b>II</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>18</b>
<b>1</b>	<b>Material .....</b>	<b>18</b>
1.1	Zelllinien .....	18
1.2	Bakterienstämme .....	18
1.3	Plasmide.....	19
1.4	Oligonukleotide .....	22
1.5	Antikörper .....	23
1.6	Enzyme und Proteine.....	25
1.7	Molekulargewichtsmarker .....	25
1.8	Zellkulturmedien und -puffer.....	26
1.9	Nährmedien für Bakterien.....	26
1.10	Antibiotika und andere Zusätze .....	27
1.11	Lösungen und Puffer.....	27
1.12	Chemikalien.....	28
1.13	Verbrauchsmaterialien und Hilfsmittel.....	29
1.14	Geräte und Apparaturen .....	29
<b>2</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>31</b>
2.1	Arbeiten mit Bakterien.....	31
2.1.1	Kultivierung und Stammhaltung von Bakterien.....	31
2.1.2	Herstellung chemokompetenter <i>E. coli</i> -Zellen .....	32
2.1.3	Herstellung elektrokompeter <i>E. coli</i> -Zellen .....	32
2.1.4	Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen .....	33
2.1.5	Elektrotransformation von <i>E. coli</i> -Zellen.....	33
2.1.6	Transformation von <i>H. pylori</i> .....	33
2.1.7	Konjugation von <i>H. pylori</i> (110) .....	34
2.1.8	Bestimmung der optischen Dichte von Bakterien.....	34
2.1.9	Zellsubfraktionierung von <i>H. pylori</i> .....	35
2.2	Arbeiten mit Zellkulturen .....	37
2.2.1	Kultivierung von Zelllinien.....	37
2.2.2	Auftauen und Einfrieren von Zelllinien.....	38
2.2.3	Zellzahlbestimmung mit der Neubauer-Zählkammer.....	39
2.2.4	Transfektion von AGS-Zellen .....	39

2.2.5	Infektionsexperimente mit <i>H. pylori</i> : Phosphotyrosin- und Phospho-GSK-Assay .....	39
2.2.6	Messung der IL-8 Produktion von AGS-Zellen mittels Sandwich-ELISA ..	40
2.3	Arbeiten mit Nukleinsäuren .....	41
2.3.1	Quanti- und qualitative Analyse von DNA .....	41
2.3.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	41
2.3.3	Präparation von Plasmiden aus <i>E. coli</i> .....	42
2.3.4	Präparation von Plasmiden aus <i>H. pylori</i> .....	43
2.3.5	Isolierung chromosomaler DNA aus <i>H. pylori</i> .....	43
2.3.6	Analytische und präparative Gelelektrophorese von DNA .....	43
2.3.7	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen .....	44
2.3.8	Ligation von DNA-Fragmenten .....	45
2.3.9	Fällung von DNA mit Ethanol .....	45
2.3.10	DNA-Sequenzierung .....	45
2.4	Allgemeine Arbeiten mit Proteinen .....	45
2.4.1	Bestimmung von Proteinkonzentrationen nach Bradford (36) .....	45
2.4.2	Herstellung bakterieller Zellysate .....	46
2.4.3	Fällung von Proteinen .....	46
2.4.4	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	47
2.4.5	Färben aufgetrennter Proteine .....	47
2.4.6	Western Blot .....	49
2.4.7	<i>In vitro</i> -Phosphorylierung von Tyr- und Ser-Resten .....	50
2.4.8	Immunpräzipitation .....	51
2.4.9	GST-pulldown Assay .....	52
2.5	Heterologe Expression, Reinigung und Charakterisierung von Fusionsproteinen .....	53
2.5.1	Expression von GST-Fusionsproteinen und Zellaufschluss .....	53
2.5.2	Affinitätschromatographie .....	54
2.5.3	Analytische Gelfiltration .....	54
2.6	Immunfluoreszenz-Mikroskopie .....	55
2.6.1	Immunfluoreszenz-Mikroskopie mit GFP-exprimierenden Bakterien .....	55
2.6.2	Doppelimmunfluoreszenzfärbung mit <i>H. pylori</i> .....	55
2.6.3	Mikroskopie transfizierter AGS-Zellen .....	56
<b>III</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>57</b>
<b>1</b>	<b>Etablierung eines Reporterassays zum Nachweis Typ IV-translozierter Proteine</b>	<b>57</b>
1.1	TEM-1 $\beta$ -Laktamase-Assay .....	58
1.2	GSK-Phosphorylierungs-Assay .....	60
<b>2</b>	<b>Charakterisierung des CagA-Translokationssignals .....</b>	<b>63</b>
2.1	Analyse von CagA-Varianten mit C-terminalen Deletionen .....	63
2.2	Analyse von CagA-Varianten mit N-terminalen Deletionen .....	65
2.3	Analyse von CagA-Varianten mit internen Deletionen .....	66
<b>3</b>	<b>Funktionelle CagA-Domänen in Wirtszellen .....</b>	<b>68</b>
3.1	Untersuchungen zur Membranlokalisation von CagA .....	68

3.2	Einfluss der EPIYA-Motive auf die CagA-Prozessierung.....	69
<b>4</b>	<b>Untersuchung von Kandidaten für weitere Effektorproteine .....</b>	<b>71</b>
4.1	Identifizierung und Sequenzanalyse interessanter PAI-Genprodukte.....	71
4.2	Screening mit dem GSK-Reporterassay auf Proteintranslokation.....	73
4.3	Lokalisation in AGS-Zellen nach Transfektion .....	76
<b>5</b>	<b>Interaktion von CagA mit seinem Sekretions-Chaperon CagF.....</b>	<b>77</b>
5.1	Identifizierung eines mit CagA interagierenden Proteins: CagF.....	77
5.2	Einfluss weiterer PAI-Proteine auf die Interaktion CagA-CagF.....	79
5.3	Ist CagF ein Substrat für Translokation? .....	80
5.4	Lokalisation von CagF in der bakteriellen Zelle .....	80
5.4.1	Osmotischer Schock und Proteasebehandlung .....	81
5.4.2	Zellfraktionierung und NaCl-Extraktion .....	81
5.4.3	Solubilisierung in Triton X-100.....	82
5.5	Herstellung einer funktionellen GFP-Fusion mit CagF .....	83
5.6	Colokalisation von CagF mit dem Apparatsprotein CagT mittels Doppel-Immunfluoreszenz .....	86
5.7	Test auf Interaktion mit dem Kopplungsprotein Cag $\beta$ .....	87
5.8	Test auf Interaktion mit dem Apparatsprotein CagY.....	88
5.9	Ort der Interaktion von CagA und CagF .....	90
5.10	Untersuchung der direkten Interaktion von CagA und CagF .....	91
5.10.1	GST-pulldown Assay mit GST-CagF in <i>E. coli</i> .....	91
5.10.2	BiFC ( <i>Bimolecular fluorescence complementation</i> )-Assay in <i>E. coli</i> .....	92
5.11	Charakterisierung der Chaperon-Binde-Domäne auf dem CagA-Protein..	93
5.12	Die Chaperon-Binde-Domäne ist notwendig für den dominant- negativen Effekt von GFP-CagA-Fusionen.....	96
5.13	Funktionelle Charakterisierung der CagA-CagF-Interaktion .....	97
5.13.1	Expression und Reinigung der GST-Fusionsproteine .....	97
5.13.2	Analytische Gelfiltration.....	99
<b>IV</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>102</b>
<b>1</b>	<b>Etablierung eines Translokationsassays.....</b>	<b>102</b>
<b>2</b>	<b>Definition verschiedener CagA-Signalbereiche .....</b>	<b>106</b>
2.1	Translokationssignal .....	106
2.2	Funktionelle CagA-Domänen in der Wirtszelle .....	113
<b>3</b>	<b>Potentielle Effektorproteine.....</b>	<b>115</b>
<b>4</b>	<b>Das Kopplungsprotein Cag<math>\beta</math>.....</b>	<b>117</b>
<b>5</b>	<b>Das Sekretions-Chaperon CagF .....</b>	<b>118</b>
5.1	Lokalisation CagF .....	120
5.2	Charakterisierung der Chaperon-Binde-Domäne.....	122
5.3	CagF ist ein Dimer und hat Chaperoneigenschaften .....	123
<b>6</b>	<b>Translokationsmechanismus .....</b>	<b>124</b>

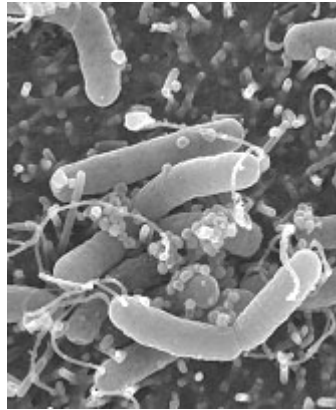
V	Zusammenfassung .....	129
VI	Summary .....	132
VII	Literaturverzeichnis .....	135
VIII	Abkürzungen .....	155
IX	Anhang .....	157
1	Schematische Darstellung der GSK-Fusionsproteine .....	157
2	Sekundärstrukturvorhersagen .....	159

# I Einleitung

## 1 Entdeckung und Epidemiologie von *H. pylori*

*Helicobacter pylori* ist ein gramnegatives, gebogenes bis spiralförmiges und polar begeißeltes, mikroaerophiles Bakterium, das den menschlichen Magen kolonisiert. Seine Assoziation mit der Geschichte der Menschheit reicht über 10.000 Jahre zurück (82,95). Es gibt sogar Hinweise auf eine frühere Besiedlung des Menschen, ausgehend von ursprünglichen *Helicobacter*-Species in frühen Säugetierarten (29,67), und eine von Afrika ausgehende, weltweite Ausbreitung des Mikroorganismus mit seinem menschlichen Wirt (61,152). 1906 wurden zum ersten Mal Bakterien im Magensekret eines Patienten beschrieben, der an Magenkrebs litt (128). Schon 1923 erkannte Konjetzny den Zusammenhang zwischen der mikrobiellen Besiedelung und Gastritis, die Anzucht *in vitro* und damit eine genauere Beschreibung gelang jedoch nicht (126,127). Im Jahre 1983 wurde *Helicobacter pylori* das erste Mal als „*unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis*“ beschrieben (251). Warren und Marshall konnten den Mikroorganismus aus Magenbiopsien in 50 % der gastroscopisch untersuchten Patienten im Royal Hospital in Perth, Westaustralien, isolieren. Die Ergebnisse der Magenbiopsien ergaben eine eindeutige Korrelation von „Schwere der Erkrankung“ mit der „Präsenz und Anzahl“ vorhandener Bakterien (149). In einem spektakulären Selbstversuch erfüllte Marshall schließlich die Koch'schen Postulate, indem er zeigte, dass der, zunächst als *Campylobacter pyloridis* bezeichnete Mikroorganismus nach Kolonisierung des Magenepithels zu massiver Gastritis führt (148).





**Abb. 1: *Helicobacter pylori*.** Die elektronenmikroskopische Aufnahme zeigt an die Magenmukosa adhärierte Bakterienzellen (von M. Rohde, Braunschweig).

Erst einige Jahre später wurde diese Spezies durch biochemische Untersuchungen sowie 16S-rRNA-Analysen als Vertreter einer neuen Gattung eingestuft und in *Helicobacter pylori* (*helico* [gr.]: spiralförmig) umbenannt (101,191). Im Jahre 2005 erhielten Robin Warren und Barry Marshall schließlich den Nobelpreis für Medizin für die Entdeckung dieses Mikroorganismus und seine Rolle bei der Entstehung von Gastritis und peptischen Ulzera (3).

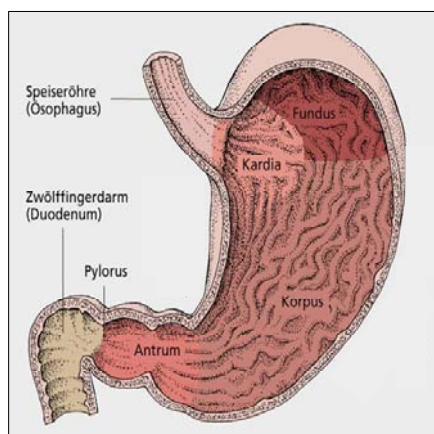
Die *Helicobacter pylori*-Infektion stellt eine der häufigsten bakteriellen Infektionen dar. Die weltweite Prävalenz variiert stark in Bezug auf die geographische Region, das Patientenalter und den sozioökonomischen Status (143,144). Die Kolonisierungsraten sind in Entwicklungsländern höher (70-90%) als in Industrieländern (25-50%) (134). Personengruppen mit einem höheren Bildungsstand zeigen in der Regel niedrigere Infektionsraten im Vergleich zu Personen mit geringerer Schulbildung (1).

Bisher wurde der Mensch als einziges Reservoir für *H. pylori* nachgewiesen, weshalb eine Übertragung von Mensch zu Mensch sehr wahrscheinlich ist. Diese erfolgt vermutlich während der frühen Kindheit über Familienmitglieder, wobei als Übertragungsweg orale- orale und fäkal-orale Kontakte in Frage kommen (132,192). Diese Annahme wird durch das gehäufte Auftreten von *H. pylori*-Infektionen innerhalb von Familien sowie die Isolierung von identischen Stämmen bei Mitgliedern einer Familie unterstützt (20,74,154). Zusätzlich könnte in Entwicklungsländern die Übertragung durch unbehandeltes Wasser und mit Abwasser kontaminiertes, ungekochtes Gemüse eine Rolle spielen (100,226).

## 2 Der Magen als ökologische Nische

Lange Zeit galt der Magen als absolut bakterienfeindliches Habitat. Die kontinuierliche Produktion eines zähflüssigen Schleims, die Anwesenheit von Immunglobulinen, eine permanente Magenperistaltik und vor allem der niedrige gastrale pH-Wert von 1 bis 3 wurden als Garant für das bakterizide Milieu gesehen. *Helicobacter pylori* hat diese unwirtliche ökologische Nische nicht nur besiedelt, sondern ist in der Lage aufgrund eines langen evolutionären Anpassungsprozesses jahrzehntelang zu persistieren.

Obwohl *H. pylori* den weitaus größten Anteil an der Mikroflora des Magens stellt, konnten Bik *et al.* durch den Nachweis von insgesamt 128 Phylotypen zeigen, dass der Magen einer diversen Mikroflora als Habitat dient (25). Diese unterscheidet sich signifikant von der Mikroflora in Mund und Ösophagus. Dabei hat die Präsenz von *H. pylori* keinen Einfluss auf die Zusammensetzung dieser mikrobiellen Gemeinschaft. Der menschliche Magen (Abb. 2) zeichnet sich durch verschiedene anatomische Bereiche aus, die sich funktionell unterscheiden. Drüsen im Bereich des Korpus, dem größten Teil des Magens, und im Fundus sekretieren Salzsäure und Verdauungsenzyme. Das Antrum enthält Zellen, die den pH-Wert sensieren und sekretiert Hormone wie Somatostatin und Gastrin, die wiederum die Säureproduktion im Korpus regulieren. Die Oberfläche des Magens besteht aus sog. Villi, Ausbuchtungen des Epithels und Crypten (Einbuchtungen) was zur Ausbildung zahlreicher Mikronischen führt. In jeder Einbuchtung besteht ein Gradient des pH-Wertes sowie anderer physikochemischer Eigenschaften.



**Abb. 2: Schematische Darstellung des menschlichen Magens.** *Helicobacter pylori* besiedelt die Antrum- und die Korpus-Region des Magens (aus (2), verändert).

*H. pylori* kann in allen Bereichen des Magens nachgewiesen werden, kommt aber weitaus am häufigsten in der Antrum-Region, die keine säuresekretierenden Parietalzellen enthält, vor (239). Um sich in der Schleimschicht des Magens zurecht zu finden, nutzt *H. pylori* den pH-Gradienten im Mukus zur chemotaktischen Orientierung (203). Der größte Teil der Bakterien lebt tief in der Mukusschicht, nahe dem Epithel. Da kontinuierlich Mukus sekretiert wird, ist eine starke Beweglichkeit sowie die beschriebene Orientierung überlebensnotwendig, um ein Abdriften in das Magenlumen und eine mit dem niedrigen pH einhergehende Wachstumshemmung sowie eine verringerte Motilität zu verhindern (204,255).

### 3 Pathogenese *H. pylori*-assoziierter Erkrankungen

Die Kolonisierung des Magenepithels durch *H. pylori* führt zunächst zur Entstehung einer akuten Gastritis, die histologisch durch die Infiltration neutrophiler Granulozyten, Lymphozyten, Plasmazellen und Monozyten gekennzeichnet ist und von einer vorübergehenden Hypochlorhydrie begleitet wird (219). So kann die akute Besiedelung der Magenschleimhaut durch *H. pylori* zu dyspeptischen Beschwerden (148) führen, verläuft aber in der Regel asymptomatisch. Diese erste Phase der Infektion geht meist innerhalb von Monaten in eine chronische Entzündung der Magenschleimhaut (chronische Gastritis) über. Die Aufrechterhaltung dieser chronischen Entzündung durch den Mikroorganismus führt bei 15 – 20 % der Infizierten zu chronisch aktiver Gastritis (161). Charakteristisch ist eine vermehrte Bildung der Entzündungsmediatoren IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 und TNF $\alpha$  (64,261) durch das Magenepithel. Die Sekretion von IL-8 ist wahrscheinlich der Schlüsselfaktor in der Wirtsabwehr im Bereich der Mukosa, da eine schnelle sowie polymorphe Immunreaktion, wie z. B. die Aktivierung neutrophiler Granulozyten, ausgelöst wird. Die erworbene Immunantwort äußert sich einerseits in der Bildung antigenspezifischer Immunglobuline der Klassen IgG und IgM (151) und andererseits in einer TH<sub>1</sub>-polarisierten T-Zell-Antwort (21). Eine Eliminierung von *H. pylori* findet jedoch nicht statt und kann weder durch Opsonierung noch durch Komplement-induzierte Lyse (186) erreicht werden. Stattdessen akkumulieren Makrophagen und Granulozyten, welche wiederum zur Entzündung beitragen (63,219) und so die Mucosa schädigen.

Der weitere klinische Verlauf hängt unter anderem von der anatomischen Lage der Gastritis ab.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Antrum-dominierende Gastritis zu einer zunehmenden Säureproduktion führt, die auch die Säurekonzentration im ersten Abschnitt des Duodenums ansteigen lässt. In Folge dessen kann es zu einer gastralen Metaplasie kommen: Die durch Säureeinwirkung zerstörten Zellen des Zwölffingerdarms werden teilweise durch Magen-Epithelzellen ersetzt (249). Eine Infektion dieses Gewebes und die damit einhergehene Ausbreitung der Entzündung werden als Vorstufe eines Zwölffingerdarmgeschwürs (*Ulcus duodeni*) angesehen (73,258).

Eine Korpus-dominierende, chronisch aktive Gastritis hingegen kann sich zu einer atrophischen Gastritis entwickeln. Die andauernde Entzündung kann hier zur Rückbildung der Drüsenzellen der Mukosa führen. In Folge dessen werden säuresekretierende Parietalzellen und mukusproduzierende Zellen zerstört und in einigen Fällen durch intestinales Gewebe ersetzt. Diese intestinale Metaplasie gilt als Vorstufe eines Adenokarzinoms (62,179). Die Entstehung eines Adenokarzinoms des Magens ist zu 70 – 90 % mit einer *H. pylori*-Infektion assoziiert (167,244).

Das Risiko, infolge einer *H. pylori*-Infektion an einem Adenokarzinom des Magens zu erkranken, ist sechsfach erhöht, weshalb die Weltgesundheitsorganisation (WHO) *H. pylori* 1994 zum Klasse I-Karzinogen erklärte (141).

Zusätzlich kann aus dem eingewanderten lymphatischen Gewebe, wie Lymphocyten und Plasmazellen, in der Magenmukosa (MALT, *mucosa-associated lymphoid tissue*) ein malignes MALT-Lymphom hervorgehen. Bei 90 % der an einem MALT-Lymphom erkrankten Personen kann eine *H. pylori*-Infektion nachgewiesen werden (178,256).

Der Verlauf einer Infektion hängt aber auch stark vom infizierenden *H. pylori*-Stamm, insbesondere von den vorhandenen Virulenzfaktoren, und von einer Vielzahl von Wirtsfaktoren, wie genetischer Prädisposition, der Immunantwort auf die Infektion und der Ernährungsweise ab.

#### 4 Virulenzfaktoren von *H. pylori*

In den Pathomechanismus einer *H. pylori*-Infektion sind eine Vielzahl von Virulenzfaktoren involviert. Die bereits beschriebene Motilität von *H. pylori* ist ein essentieller Faktor, um eine Infektion erfolgreich zu etablieren. Diese Beweglichkeit wird bedingt durch die helikale Form des Bakteriums sowie zwei bis sieben unipolar angeordnete Flagellen. Diese sind aus den Flagellinproteinen FlaA und FlaB aufgebaut, wobei letzteres vor allem an der Basis der Flagelle lokalisiert ist (137,227). *H. pylori* muss im sauren Milieu überleben können und ist daher auf ein  $\text{Ni}^{2+}$ -haltiges Protein, die Urease, angewiesen (120). Dieses ist zu 90 % im Cytoplasma der Zelle lokalisiert und kann nur in geringen Mengen auf der Bakterienoberfläche oder im Medium nachgewiesen werden (180). Die Urease hält im Inneren des Bakteriums einen neutralen pH-Wert aufrecht, indem Harnstoff in Hydrogencarbonat und Ammoniak gespalten wird.  $\text{NH}_3$  puffert einströmende Protonen und ermöglicht somit eine Aufrechterhaltung des Membranpotentials zur Energiegewinnung (187). Die Aufnahme von Harnstoff wird durch den Protonen-kontrollierten Harnstoffkanal UreI reguliert, der sich bei niedrigem pH-Wert öffnet (253). Sowohl die Motilität als auch die Urease sind, wie im Tiermodell gezeigt werden konnte, essentiell für die Kolonisierung (75,76).

Die Fähigkeit, an Epithelzellen zu adhären, ist ein weiterer Virulenzfaktor von *H. pylori*, um einem Abtransport durch Peristaltik und Mukus-Erneuerung entgegenzuwirken. Die Adhärenz wird über verschiedene Proteine der OMP (*outer membrane protein*) - Familie wie BabA, SabA oder AlpA und AlpB vermittelt. Die Rezeptoren der beiden zuletzt genannten Proteine sind noch nicht bekannt (165). BabA bindet an das Lewis<sup>b</sup>-Blutgruppenantigen und wird mit dem Auftreten von Ulkus und Magenkarzinom in Verbindung gebracht (34,94,122,183). Als weiteres Adhäsins konnte SabA identifiziert werden, welches an sialylierte Glykoproteine, die vor allem in entzündetem Gewebe vorliegen, bindet (169,170).

Zusätzlich virulenzassoziiert sind eine Reihe von Enzymen wie Katalase, Superoxid-Dismutase, Lipase, Phospholipase und Proteasen, die in allen beschriebenen *H. pylori*-Stämmen produziert werden, sowie Toxine, wie das vakuolisierende Cytotoxin A (VacA) und das immunogene Cytotoxin-assoziierte Antigen A (CagA). Letzteres ist auf der sog. *cag*-Pathogenitätsinsel (*cag*-PAI) zusammen mit einem Typ IV-Proteinsekretionssystem codiert (siehe 5). Das Protein VacA gehört zur Familie der Autotransporter und wird in das extrazelluläre Medium sekretiert (85). VacA begünstigt die Kolonisierung von Mäusen (194) und wird mit der Zerstörung des Magenepithels (232) und der Entwicklung von Ulzera (166) in Zusammenhang gebracht. Zusätzlich kann VacA die Aktivierung von T-Lymphocyten verhindern (93) und stört den intrazellulären Vesikeltransport (197). Aufgrund des Vorhandenseins der *cag*-PAI und eines best. *vacA*-Genotyps (s1/m1) und der dadurch erhöhten Virulenz werden *Helicobacter*-Stämme in Typ I- und Typ II-Stämme eingeteilt. Typ II-Stämme weisen keine *cag*-PAI auf und produzieren inaktives oder nur für best. Zelllinien aktives VacA und werden mit einer milden Gastritis assoziiert (259).

## 5 Die *cag*-Pathogenitätsinsel und das CagA-Protein

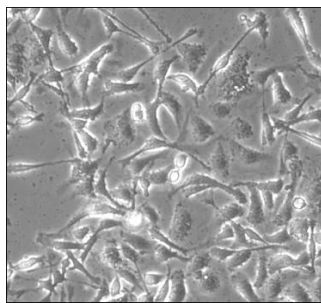
Pathogenitätsinseln (PAIs) stellen distinkte DNA-Bereiche im Genom pathogener Bakterien dar, die sich vom restlichen Genom durch strukturelle Besonderheiten unterscheiden und stark mit Virulenz assoziiert sind. So sind u. a. auch in den Gattungen *Salmonella*, *Yersinia* und *Escherichia* zahlreiche Beispiele für, meist durch horizontalen Gentransfer erworbene, Pathogenitätsinseln bekannt. Typische Merkmale sind eine Flankierung der PAI mit direkten Wiederholungssequenzen (105) oder das Vorhandensein von IS-Elementen (84), die zu Neuordnungen der Sequenz und damit zu einem teilweisen oder vollständigen Verlust führen können, wie bei einigen *H. pylori*-Stämmen gezeigt werden konnte (46). Einige PAIs codieren, wie bei *H. pylori*, für Sekretionssysteme (215).

Bei der *cag*-Pathogenitätsinsel (*cag*-PAI) handelt es sich um eine 37 kb große Region im Genom von *H. pylori*-Typ I-Stämmen, die in das chromosomale Glutamylglutaminasegen integriert ist, wahrscheinlich durch horizontalen Gentransfer erworben wurde (46) und durch direkte 31 bp-Sequenzwiederholungen flankiert wird.

Die *cag*-PAI codiert für ein sogenanntes Typ IV-Proteinsekretionssystem und weist starke Homologien zum *virB*-Operon des pflanzenpathogenen Bakteriums *Agrobacterium tumefaciens* auf. Auf der *cag*-Pathogenitätsinsel sind 27 putative Gene lokalisiert, eines davon codiert für das Cytotoxin-assoziierte Antigen A, das CagA-Protein. Acht der 27 *open reading frames* weisen signifikante Homologien zu bekannten Genen anderer Typ IV-Sekretionssysteme auf. In Abb. 4 ist eine schematische Darstellung der *cag*-PAI des *H. pylori*-Stammes 26695 abgebildet. Die genannten Homologien sowie die beiden gebräuchlichsten Nomenklaturen (46,236) sind angegeben. In der vorliegenden Arbeit wird aus praktischen Gründen die alphabetische Nomenklatur nach Censini *et al.* (46) verwendet. Durch Transposonmutagenese (87) wurden alle Gene der Pathogenitätsinsel deletiert und aufgrund ihres Einflusses auf zwei, im Folgenden genauer beschriebene, Phänotypen charakterisiert: Die Translokation von CagA, die durch dessen Phosphorylierung in Epithelzellen nachgewiesen wird, sowie die Induktion von IL-8, die im verwendeten Stamm 26695 CagA-unabhängig ist, sind von der Präsenz eines funktionellen Sekretionssystems abhängig.

Zunächst ist das Cag-T4SS für die direkte Translokation des bakteriellen CagA-Proteins ins Cytoplasma von Epithelzellen und Zellen des Immunsystems verantwortlich. Die Größe des CagA-Proteins variiert je nach *H. pylori*-Stamm zwischen 128 und 145 kDa, was auf der Duplikation von internen Gensequenzen beruht (60). Nach der Translokation in Wirtszellen wird CagA durch Proteintyrosinkinasen der Src-Familie (c-Src, Lyn) an Tyrosinresten phosphoryliert (210,225). In Zellen des Immunsystems, wie Phagozyten und dendritischen Zellen, wird das CagA-Protein in ein stabiles 100 kDa-Fragment und ein tyrosinphosphoryliertes 40 kDa-Fragment gespalten (92,163). Diese Tyrosinphosphorylierung findet an den EPIYA-Motiven statt, die in variabler Anzahl in der C-terminalen EPIYA-Region des CagA-Proteins vorkommen und aus den fünf Aminosäuren Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala bestehen (17). Aufgrund homologer Rekombination innerhalb des *cagA*-Gens sind vier verschiedene EPIYA-Varianten (EPIYA-A bis -D) bekannt (113,115). Die C- und D-Varianten sind hauptsächlich Gegenstand der Phosphorylierung; sie interagieren in phosphoryliertem Zustand mit der Tyrosinphosphatase SHP-2.

Diese Interaktion dereguliert die SHP-2-Funktion (114), welche aktiviert wird, die *focal adhesion kinase* dephosphoryliert, dadurch inaktiviert, und so den *hummingbird*-Phänotyp und erhöhte Zellmotilität induziert (237). Der *hummingbird*-Phänotyp stellt eine morphologische Veränderung der Zellen dar, die auch bei einer Behandlung mit dem Wachstumsfaktor HGF (*hepatocyte growth factor*) beobachtet werden kann. Dieser Phänotyp ist durch dramatische Zell-Elongation charakterisiert und findet nur bei Infektion mit *cag*<sup>+</sup>, nicht aber *cag*<sup>-</sup> *H. pylori*-Stämmen statt (207,208).



**Abb. 3: Der *hummingbird*-Phänotyp.**  
Eine charakteristische morphologische Veränderung von Epithelzellen bei Infektion mit *H. pylori* *in vitro*.

Die Interaktion zwischen CagA und SHP-2 ist nicht die einzige, die morphologische Veränderungen in Wirtszellen auslöst. CagA assoziiert weiterhin mit Proteinen, die für die Integrität der *tight junctions* notwendig sind (ZO-1, JAM) (9). Dadurch wird die funktionelle Zusammensetzung der *tight-junction* Komponenten des Epithels verhindert und die epitheliale Barriere zerstört. Wahrscheinlich erhöht sich dadurch die Verfügbarkeit essentieller Nährstoffe wie Fe<sup>3+</sup> und Ni<sup>2+</sup>.

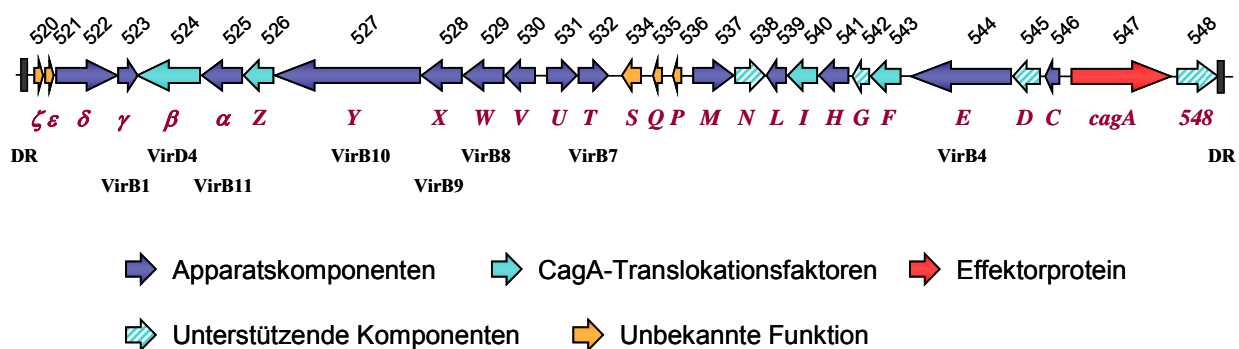
Tyrosinphosphorylierung, SHP-2-Bindung und die Induktion morphologischer Veränderungen variieren zwischen einzelnen CagA-Molekülen und werden durch die Variationen in der Anzahl und der Sequenz der Tyrosinphosphorylierungsmotive determiniert (158).

Eine weitere Funktion der *cag*-PAI ist die Induktion proinflammatorischer Cytokine, vor allem IL-8, in den Epithelzellen der Magenmukosa (46). Eine IL-8 Induktion setzt den direkten Kontakt von Bakterium und Wirtszelle voraus (189). Der Mechanismus konnte bisher nur teilweise geklärt werden. Allerdings scheint das Vorhandensein eines kompletten T4SS für die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB und somit die IL-8-Induktion notwendig zu sein, da nach Deletion apparatscodierender Gene in Infektionsexperimenten keine IL-8-Induktion mehr nachzuweisen ist (87).



Eine Translokation von CagA hat im Stamm 26695 keinen Einfluß auf die Induktion von IL-8 (65,87,189). Bei anderen *H. pylori*-Stämmen, wie dem Stamm P12, zeigte sich bei der *cagA*-Mutante im Vergleich mit dem Wildtyp eine um 40 % verringerte Fähigkeit IL-8 zu induzieren. Inzwischen wird vermutet, dass die IL-8 Produktion durch die Übertragung von Peptidoglykanstücken durch den Translokationskanal in die Wirtszelle induziert wird (243). Zusätzlich scheint auch das Protein OipA (*outer inflammatory protein A*), allerdings *cag*-unabhängig, an der IL-8-Induktion beteiligt zu sein (262).

Aufgrund der beschriebenen Phänotypen konnten die Genprodukte der *cag*-PAI in drei Klassen eingeteilt werden: (a) Essentielle Apparatskomponenten, (b) Faktoren, die notwendig sind für die CagA-Translokation, aber keinen Einfluss auf die IL-8-Induktion haben und (c) Proteine, die hierfür keine Rolle spielen.



**Abb. 4: Darstellung der *cag*-Pathogenitätsinsel (*cag*-PAI) des *H. pylori*-Stammes 26695.** Die offenen Leserahmen sind als Pfeile dargestellt und mit den durchlaufenden Nummern der Gensequenz des Stammes 26695 nach Tomb *et al.* (236) bezeichnet. Die ebenfalls gebräuchliche, in dieser Arbeit verwendete, Nomenklatur nach Censini *et al.* (46) ist unterhalb der zugehörigen Gene in rot angegeben. Homologien zum *virB*-Operon in *A. tumefaciens* sind in schwarz angegeben. Die flankierenden direkten Sequenzwiederholungen (*direct repeats*, DR) sind durch schwarze Kästchen dargestellt.

Gezeigt wurde, dass von 18 für die CagA-Translokation verantwortlichen Genprodukten nur 14 am Apparatsaufbau beteiligt sind. 4 weitere Proteine scheinen zusätzlich essentielle Funktionen für die CagA-Translokation aufzuweisen und werden daher als Translokationsfaktoren bezeichnet (86).

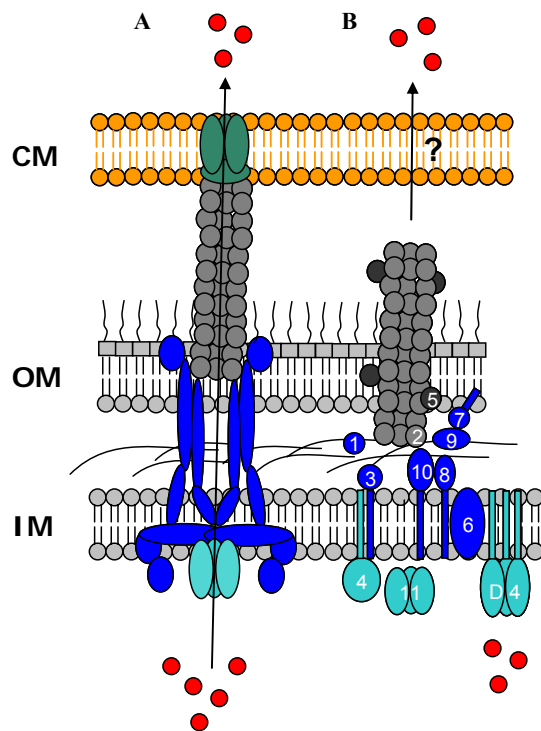
Die molekularen Mechanismen des CagA-Translokationsprozesses, die notwendigen Interaktionen sowie Signalsequenzen sind im Cag-Typ IV-Sekretionssystem weitgehend unbekannt. Andere Systeme der bakteriellen Proteinsekretion und –translokation sind hingegen wesentlich besser untersucht.

## 6 Erkennung und Translokation von Effektorproteinen

Bakterielle Protein-Sekretionssysteme werden anhand einer numerischen Klassifikation (Typ I bis Typ V bzw. VI) eingeteilt (233). Bei Typ I-Systemen, auch ABC (*ATP binding cassette*) -Transporter genannt, verläuft die Sekretion in einem einstufigen Prozess über beide Membranen hinweg und bedarf mindestens dreier Komponenten, die eine Kanalstruktur zwischen Cytoplasma und extrazellulärem Medium bilden (26). Typ II-Sekretionssysteme (*general secretory pathway*, GSP) (196) vermitteln den Export aus dem Periplasma über ein sogenanntes Secreton, welches aus 12 - 16 verschiedenen Komponenten besteht (184). Der Transport über die innere Membran kann dabei Sec-abhängig oder über alternative Wege, wie etwa das Tat (*Twin-arginine translocation*)-System, erfolgen (24,216,247). In Typ V-Sekretionssystemen (110), die auch als Autotransporter bezeichnet werden, werden Proteine zunächst Sec-abhängig ins Periplasma transportiert und anschließend durch Insertion eines Molekülteils ( $\beta$ -Domäne) durch die äußere Membran transportiert. Erst kürzlich wurde ein neuartiges Sekretionssystem (Typ VI) postuliert, mit Hilfe dessen die Sekretion des Hcp1-Proteins in *P. aeruginosa* erfolgt (77).

Nicht nur um Sekretion in das umgebende Medium geht es hingegen bei Typ III- und Typ IV-Sekretionssystemen, sondern um einen direkten, kontaktabhängigen Transport von Effektorproteinen vom Bakterium in eukaryotische Wirtszellen. Diese spezialisierten, funktionell ähnlichen aber mechanistisch absolut unterschiedlichen, Sekretionssysteme sind eine gemeinsame Strategie verschiedener gramnegativer Mikroorganismen, um eine Infektion zu etablieren. Typ III-Sekretionssysteme zeigen eine phylogenetische Verwandtschaft zu den Multiproteinkomplexen bakterieller Flagellen, während Typ IV-Systeme von Proteinkomplexen abstammen, die den konjugativen Transfer von DNA vermitteln.

Obwohl beide Systeme den Transport von Protein zu Zielzelle vermitteln, scheint die Erkennung der Substrate sowie die „Sekretionsinformation“, die in den Effektormolekülen vorkommt, hoch divers zu sein.



**Abb. 5: Translokation bakterieller Effektorproteine. Schematische Darstellung der Typ III- und Typ IV-Sekretionssysteme gramnegativer Mikroorganismen.** (A) Das T3SS besteht aus einem Basalkörperkomplex (blau), der Nadel (grau), dem Translokator (grün) und einer energieliefernden ATPase (türkis). (B) Das VirB-T4SS von *A. tumefaciens* besteht aus dem Pilus (grau), strukturellen Komponenten (blau) und ATPasen (türkis). Diese beiden Systeme vermitteln den Transport von Effektorproteinen (rot) über die innere Membran (IM), die äußere Membran (OM) und über die Membran der eukaryotischen Wirtszelle, wobei der Mechanismus im VirB-System noch unbekannt ist (basierend auf (44,52,146)).

## 6.1 Typ III-Sekretionssysteme

Typ III-Translokationssysteme sind in einer Vielzahl von tier- und pflanzenpathogenen Mikroorganismen identifiziert worden (58,80). Das Ysc (*Yop secretion*) –System in *Yersinia* stellt jedoch das am besten untersuchte T3SS dar. Nach dem Aufbau der funktionellen Nadelstruktur können Effektorproteine ins extrazelluläre Medium sekretiert werden. Für einen Transport ins Cytoplasma der Wirtszelle ist eine weitere Klasse von Proteinen, die sog. Translokatoren notwendig, die in die Wirtszellmembran inserieren und so einen Kanal für den Proteintransfer bilden (159). Bislang sind sechs Effektorproteine bekannt, die über das T3SS in eukaryotische Zielzellen injiziert werden: Yop (*Yersinia outer protein*) E, H, M, O, P und T.

Studien über Sekretionssignale in T3-Effektorproteinen haben gezeigt, dass die C-terminalen Bereiche dieser Proteine nicht für den Transport benötigt werden. So konnte ein N-terminales Signal einer Länge von ca. 20 Aminosäuren in den meisten untersuchten Substraten nachgewiesen werden. Dieses N-terminale Signal ist *in vitro* ausreichend für eine Sekretion ins Medium, allerdings nicht für eine Translokation (220). Ein zweites Element stromabwärts des Sekretionssignals, mit einer Länge von 60 bis 100 Aminosäuren, erwies sich als essentiell für den Transport von Hybridproteinen in eukaryotische Zellen (220). Dieser Bereich ist notwendig für die Assoziation eines T3-Sekretions-Chaperons mit seinem entsprechenden Effektorprotein (51,252). T3-Sekretions-Chaperone sind kleine (durchschnittlich 15 kDa) und saure (pI 4-5) Proteine, die mit ihren Substraten heterotrimere Komplexe im Verhältnis 1:2 (Substrat : Chaperon) (27,181) bilden. Die Kristallstrukturen vieler T3S-Chaperone konnten bereits aufgeklärt werden und zeigen, dass trotz fehlender Ähnlichkeit in der Primärsequenz eine nahezu identische Struktur vorherrscht (96). Beide Hälften des Chaperon-Dimers enthalten oberflächenexponierte, hydrophobe  $\beta$ -Faltblattbereiche, die die Interaktionsfläche mit dem Effektorprotein darstellen.

Durch die Co-Kristallisierung des T3-Effektorproteins YopE mit seinem Chaperon SycE konnte gezeigt werden, dass ausschließlich im Bereich der Interaktionsfläche eine Entfaltung des Substrates stattfindet. Birtalan *et al.* postulieren, dass dieser Konformationswechsel möglicherweise ein Chaperon-vermitteltes Sekretionssignal darstellt (27). Zusätzlich wurde nachgewiesen, dass eine weitere Funktion von Chaperonen darin besteht, die zugehörigen Substrate zum richtigen Transportsystem zu rekrutieren. Nach Entfernung der Chaperonbindedomäne der beiden Effektorproteine SopE und SptP in *S. enterica* erfolgte der Export über das Flagellensystem und nicht durch das zugehörige SPI-1 T3SS (78,135).

## 6.2 Typ IV-Sekretionssysteme

T4SS repräsentieren modifizierte Konjugationssysteme, die über einen Multiprotein-Apparat, den *mating pair formation*-Komplex (Mpf), Proteine oder Nukleoproteinkomplexe in Rezipientenzellen transferieren (133). Die oft mit bakterieller Virulenz assoziierten T4SS können genetisch aufgrund von Sequenzhomologien in zwei verschiedene Klassen eingeteilt werden, T4a und T4b (53,213). T4a-Systeme stellen hochkonservierte Apparate dar und werden von dem am besten untersuchten Modell, dem VirB/D4-System in *Agrobacterium tumefaciens* vertreten. Mit Hilfe des VirB/D4-T4SS kann das Bodenbakterium Wurzelhalstumore in Pflanzen induzieren. Der Apparat (siehe Abb. 5) besteht aus 12 Genprodukten, VirB1-VirB11 und dem mit der inneren Membran assoziierten Kopplungsprotein VirD4, die von einem Operon (*virB*) codiert werden (52). Die für den Aufbau und die Funktion des Apparates benötigte Energie wird wahrscheinlich von den drei ATPasen VirB4, VirB11 und VirD4 zur Verfügung gestellt. Mit Hilfe dieses Systems transferiert *A. tumefaciens* einen Nukleoproteinkomplex, bestehend aus T-DNA und dem VirD2-Protein, über beide bakteriellen Membranen in die Wirtszelle. Dabei wirkt VirD2 als Relaxase und wird als Substrat für die Translokation erkannt. Nach dem Transport wird die einzelsträngige DNA in den Zellkern transportiert und in das Genom integriert (267). Als weitere Effektoren werden die Proteine VirE2, VirE3 und VirF in die Pflanzenzelle transloziert (202,240,250).

Die Signale, die zur Erkennung von Substraten dienen, sind in T4SS trotz intensiver Forschungsarbeiten noch weitgehend unbekannt. Bisher konnte gezeigt werden, dass im *A. tumefaciens* VirB/D4-System der C-Terminus notwendig und auch ausreichend für eine Translokation ist (240-242). Durch Sequenzvergleiche und eine umfassende Mutagenese konnte bewiesen werden, dass ein positiv geladener C-terminaler Bereich sowie ein konserviertes, Arginin-reiches Motiv das Translokationssignal ausmachen (242). Aufgrund dessen konnten zwei neue Effektorproteine identifiziert werden: VirE3 und VirD5 (202,242).

Die Erkennung von Effektorproteinen als Typ IV-Substrate beruht wahrscheinlich auf einer bestimmten Gruppe von Proteinen, den Kopplungsproteinen (13,97,140). So konnte bereits gezeigt werden, dass das Kopplungsprotein VirD4 mit dem Effektor VirE2 interagiert (13). Abgesehen von Apparatskomponenten und Kopplungsprotein sind für viele Effektorproteine zusätzliche Faktoren notwendig. So hängen z. B. Stabilität und Sekretion von VirE2 des VirB/D4-Systems von dem Sekretions-Chaperon VirE1 ab (72,228,265). Andere VirB/D4-Effektoren scheinen hingegen kein Chaperon für die erfolgreiche Translokation zu benötigen.

Auch in *Mesorhizobium loti* konnte ein, bisher allerdings kaum charakterisiertes, VirB/D4-T4SS beschrieben werden. Bekannt ist, dass dieses Sekretionssystem eine entscheidende Rolle in der Bildung von Wurzelknöllchen an verschiedenen Leguminosen spielt und im Großteil der untersuchten Stämme exprimiert wird (121).

Effektorproteine des VirB-Systems in *Bartonella henselae* benötigen sowohl einen positiv geladenen C-terminalen Molekülbereich als auch eine zusätzliche konservierte Domäne (206). So enthalten die sieben für die Virulenz notwendigen Effektorproteine BepA-BepG eine 140 Aminosäuren umfassende Domäne im C-terminalen Bereich, die sog. BID (*Bep intracellular delivery*)-Domäne. Im Gegensatz dazu, stellt das Pertussistoxin-Sekretionssystem (Ptl) ein ganz anderes Beispiel eines modifizierten T4SS dar. Hier wird das AB-Holotoxin Sec-abhängig in das Periplasma transportiert und erst der Export über die äußere Membran erfordert die VirB-homologen Komponenten PtlA-I (40). Das Cag-T4SS wird ebenfalls in die Gruppe der T4a-Systeme eingeordnet.

T4b-Sekretionssysteme zeigen genetisch wenig Ähnlichkeiten mit den T4a-Systemen, stellen aber möglicherweise komplexere Mechanismen dar, da bis zu 26 Gene für die Funktion notwendig sind (209). Das erste System wurde in *L. pneumophila* entdeckt, einem Mikroorganismus, der das T4SS einsetzt, um in intrazellulären Kompartimenten zu überleben und zu replizieren. Die beteiligten Gene werden „*defect for organelle trafficking*“ (*dot*) und „*intracellular multiplication*“ (*icm*) genannt.

Der Transport des Proteins RalF in *Legionella pneumophila* über das Dot/Icm-System ist ebenfalls abhängig von einer kurzen, C-terminalen Region (156). Inzwischen sind verwandte Systeme in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Coxiella burnetii* und *Xanthomonas* ssp. gefunden worden (212,213,234). Effektorproteine sind hier jedoch noch nicht bekannt.

Typ-IV Sekretionssysteme sind wichtige Virulenzfaktoren gramnegativer Bakterien, die entscheidend zum Überleben im Wirtsorganismus und zur Etablierung der Infektion beitragen. Der Aufbau dieser Apparate ist zumindest am Modellsystem VirB/D4 in *Agrobacterium tumefaciens* weitgehend aufgeklärt. Aufgrund von Homologien und biochemischen Untersuchungen konnte inzwischen auch ein vorläufiges Modell des Cag-T4SS aufgestellt werden (38). Einzelheiten des molekularen Mechanismus des Transportes und eine Charakterisierung notwendiger Sekretionssignale sind jedoch weitgehend unbekannt.

## **7 Ziele dieser Arbeit**

Das CagA-Protein ist das einzige bekannte Effektorprotein des Cag-T4SS in *Helicobacter pylori*. Der Nachweis einer erfolgten Translokation in die eukaryotische Wirtszelle ist bisher nur über die Tyrosinphosphorylierungen der EPIYA-Region mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers gegen phosphorylierte Tyrosinreste möglich. Nicht bekannt ist, wo genau in der Zelle diese Phosphorylierung stattfindet und ob dazu eventuell eine Rekrutierung von CagA an die Plasmamembran der Zelle notwendig ist. Aus diesem Grund sollte zunächst ein neues Reportersystem etabliert werden, das unabhängig von einer Lokalisation in der Zielzelle die Möglichkeit bietet, translozierte Substrate in cytosolischen Zellkompartimenten nachzuweisen.

Mit Hilfe dieser Nachweismethode sollten für die Translokation notwendige, bzw. ausreichende, Bereiche des CagA-Moleküls näher bestimmt werden. Ferner war eine genauere Charakterisierung des Translokationssignals Bestandteil dieser Arbeit.

Die gewonnenen Erkenntnisse sollten zur Identifizierung weiterer potentieller Effektorproteine herangezogen und diese auf Sekretion ins Wirtszellcytosol mit dem neu etablierten Reporterassay überprüft werden.

18 Genprodukte der *cag*-PAI haben sich als essentiell für die CagA-Translokation erwiesen, jedoch sind nur 14 dieser Proteine am Aufbau der Apparatsstruktur beteiligt (87). Die übrigen 4 Moleküle (Cag $\beta$ , CagF, CagZ, CagI) sind für die Sekretion des CagA-Moleküls zwar absolut notwendig, ihre genaue Funktion ist jedoch nicht bekannt. Deshalb sollte versucht werden, mögliche Interaktionen mit dem CagA-Molekül nachzuweisen und diese gegebenenfalls näher zu charakterisieren.



## II Material und Methoden

### 1 Material

#### 1.1 Zelllinien

AGS	humane Magenadenokarzinom-Zelllinie (ATCC CRL-1739)
J774A.1	murine Makrophagen-Zelllinie (ATCC TIB-67)
St3051	humane Magenadenokarzinom-Zelllinie (246)
THP-1	humane Monocyten-Zelllinie (ATCC TIB-202)
HeLa	humane Cervixkarzinom-Zelllinie (DSMZ ACC 57)
Jurkat E6.1	humane T-Zelllinie (ATCC TIB-152)

#### 1.2 Bakterienstämme

Alle in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme und relevante Eigenschaften sind in den Tabellen 1, 2 und 3 aufgeführt.

**Tab. 1: *Escherichia coli*-Stämme**

Stamm	Eigenschaften/Genotyp	Referenz
DH5α (E142)	F <sup>-</sup> $\phi$ 80lacZΔM15Δ(lacZYA-argF) U169 deoR recA 1 endA 1 hsdR 17(rk <sup>-</sup> mk <sup>+</sup> ) supE 44 thi -1 λ- <i>gyrA</i> 96 relA 1	Gibco/Invitrogen
TOP10	F <sup>-</sup> $\phi$ 80lacZΔM15Δ(lacZYA-argF) U169 deoR recA 1 araD 139Δ(ara-leu) 7697 galU galK rpsL (Str <sup>R</sup> ) endA 1 nupG	Invitrogen
β2155	<i>thrB</i> 1004 <i>pro</i> <i>thi</i> <i>strA</i> <i>hsdS</i> lacZΔM15 (F' lacZΔM15 lacI <sup>q</sup> <i>tra</i> Δ36 <i>proA</i> <sup>+</sup> <i>proB</i> <sup>+</sup> ) Δ <i>apA</i> ::erm (Erm <sup>R</sup> ) pir::RP4 [::kan (Km <sup>R</sup> ) SM10]	(70)
BL21(DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT</i> <i>hsdS<sub>B</sub></i> (r <sup>B</sup> - m <sup>B</sup> -) <i>gal dcm</i> (DE3)	Novagen

**Tab. 2: *Yersinia enterocolitica*-Stamm**

Stamm	Eigenschaften/Genotyp	Referenz
WA314	Serotyp 0:8	(109)

**Tab. 3: *Helicobacter pylori*-Stämme**

Stamm	Eigenschaften/Genotyp	Referenz
P12	Klinisches Isolat (888-0) der Abteilung „Medizinische Mikrobiologie und Immunologie“ der Universität Hamburg	(200)
P1	Klinisches Isolat (69A) der Abteilung „Medizinische Mikrobiologie“ der Universität Amsterdam	(104)
26695	komplett sequenzierter Stamm	(236)
J99	komplett sequenzierter Stamm	(8)
P12 $\Delta$ cagA	P12cagA <sup>-</sup> , Kan <sup>R</sup> , hergestellt mit	(185)
P17	P12cagA <sup>-</sup> , Cam <sup>R</sup> , hergestellt mit pWS30	(200)
P12 $\Delta$ cagF	P12cagF <sup>-</sup> , Cam <sup>R</sup> , hergestellt mit pSO174	
P12 $\Delta$ PAI	P12, Deletion der cag-PAI	(163)
P12 $\Delta$ PAI[pJP55]	P12 $\Delta$ PAI komplementiert mit pJP55 (cagA <sub>P12</sub> )	J. Püls
P76	P1, Strep <sup>R</sup>	W. Fischer
26695 $\Delta$ cagA	26695cagA <sup>-</sup> , Kan <sup>R</sup> , hergestellt mit pJP52	J. Püls
26695 $\Delta$ cagV	26695cagV <sup>-</sup> , Cam <sup>R</sup> , hergestellt mit pRB26	R. Buhrdorf
26695 $\Delta$ cagF	26695cagF <sup>-</sup> , Cam <sup>R</sup> , hergestellt mit pSO174	S. Odenbreit
26695 $\Delta$ cagZ	26695cagZ <sup>-</sup> , Cam <sup>R</sup> , hergestellt mit pRB25	R. Buhrdorf
26695 $\Delta$ cagI	26695cagI <sup>-</sup> , Cam <sup>R</sup> , hergestellt mit pSO171	S. Odenbreit
26695 $\Delta$ cag $\beta$	26695cag $\beta$ <sup>-</sup> , Cam <sup>R</sup> , hergestellt mit pJP93	J. Püls

### 1.3 Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tab. 4 aufgelistet. Eine graphische Übersicht aller in dieser Arbeit beschriebenen Konstrukte ist im Anhang dargestellt.

**Tab. 4: Plasmide**

Name	Relevante Eigenschaften	Referenz
pGEX4T-3	Expression von <i>gst</i> -Fusionen, Amp <sup>R</sup>	Amersham Pharmacia
pEYFP-C3	Expression C-terminaler <i>gfp</i> -Fusionen in eukaryotischen Zellen, Kan <sup>R</sup> , Neo <sup>R</sup>	BD Biosciences Clontech
pEGFP-N1	Expression N-terminaler <i>gfp</i> -Fusionen in eukaryotischen Zellen, Kan <sup>R</sup> , Neo <sup>R</sup>	BD Biosciences Clontech
pCDFDuet-1	Expression eines oder zweier ORFs, P <sub>T7</sub> , <i>aadA</i> (Sm <sup>R</sup> )	Novagen
pBluescriptKS-	Klonierungsvektor, Amp <sup>R</sup>	Stratagene

Name	Relevante Eigenschaften	Referenz
pHel2	<i>E. coli</i> -Hp „shuttle-vector“, ori <sup>colE1</sup> , oriT, cat <sup>GC</sup>	(111)
pHel3	<i>E. coli</i> -Hp „shuttle-vector“, ori <sup>colE1</sup> , oriT, aphA-3	(111)
pYopE <sub>129</sub> -GSK	pBlueskriptKS, <i>yopE</i> (codons 1-129)-gsk	(91)
pCX302	pCX340, tir-blaM, Tet <sup>R</sup>	(47)
pGFPMut-2		(57)
pip8	pHel2, P <sub>cagA</sub> , <i>gsk-cagA</i> (codons 1020-1214)	
pip9	pHel2, P <sub>cagA</sub> , <i>gsk-cagA</i> ( <i>H. pylori</i> P12)	
pip9-2	pHel2, P <sub>cagA</sub> , <i>gsk-cagA</i> (codons 1-702)	
pip14	pHel2, P <sub>cagA</sub> , <i>gsk-cagS</i> ( <i>hp534</i> )	
pip15	pHel2, P <sub>cagA</sub> , <i>gsk-cagF</i> ( <i>hp543</i> )	
pip17	pHel2, P <sub>cagA</sub> , <i>gsk-cagA</i> (codons 40-1214)	
pip18	pHel2, P <sub>cagA</sub> , <i>blaM-cagA</i> ( <i>H. pylori</i> P12)	
pip18a	pHel2, P <sub>cagA</sub> , <i>blaM-cagA</i> (codons 614-1214)	
pip22	pHel2, P <sub>cagA</sub> , <i>cagA</i> (codons 1-613)-gsk	
pip23	pHel2, P <sub>cagA</sub> , <i>gsk-cagA</i> (codons 352-1214)	
pip24	pHel2, P <sub>cagA</sub> , <i>gsk-cagζ</i> ( <i>hp520</i> )	
pip25	pHel2, P <sub>cagA</sub> , <i>gsk-cagQ</i> ( <i>hp535</i> )	
pip26	pHel2, P <sub>cagA</sub> , <i>gsk-cagQ</i> (codons 26-238)	
pip28	pHel2, P <sub>cagA</sub> , <i>gsk-cagε</i> ( <i>jhp470</i> ) ( <i>H. pylori</i> J99)	
pip29	pHel2, P <sub>cagA</sub> , <i>gsk-cagA</i> (Δ172-1760)	
pip30	pHel2, P <sub>cagA</sub> , <i>gsk-cagA</i> (Δ1840-3056)	
pip31	pJP99, P <sub>cagA</sub> , <i>cagF-gfp</i>	
pip32	pCDFDuet-1, <i>gsk-cagF</i>	
pip35	pHel2, P <sub>cagA</sub> , <i>gsk-cagA</i> (codons 1-1202) Δ12C	
pip39	pHel2, P <sub>cagA</sub> , <i>gfp'C-cagA</i>	
pip40	pJP99, P <sub>cagA</sub> , <i>cagF-N'gfp</i>	
pip44	pJP99, P <sub>cagA</sub> , <i>N'gfp</i> (codons 1-154)	
pip45	pHel2, P <sub>cagA</sub> , <i>gfp'C</i> (codons 153-238)	
pip46	pEGFP-N1, <i>cagε-gfp</i>	
pip47	pEGFP-N1, <i>cagF-gfp</i>	
pip48	pHel2, P <sub>cagA</sub> , <i>gsk-cagA</i> (codons 847-1033)	
pip51	pEYFP-C3, <i>gfp-cagA</i>	
pip52	pEYFP-C3, <i>gfp-cagA</i> (codons 602-1214)	
pip53	pEYFP-C3, <i>gfp-cagA</i> (codons 1019-1214)	
pip54	pEYFP-C3, <i>gfp-cagA</i> (codons 847-1033)	
pip56	pHel2, P <sub>cagζ</sub> , <i>cagζ-gsk</i>	
pip58	pEYFP-C3, <i>gfp-cagζ</i>	
pip57	pHel2, P <sub>cagζ</sub> , <i>gsk-cagζ</i>	
pJP55	pHel2, <i>cagA</i> ( <i>H. pylori</i> 26695)	J. Püls
pJP79	pHel2, <i>cagA</i> ( <i>H. pylori</i> P12)	J. Püls

Name	Relevante Eigenschaften	Referenz
pJP89A	pBA, $\Delta$ hp527::cat	(87)
pJP99	pBA, <i>recA</i> (5'), Kan <sup>R</sup> ( <i>aphA</i> -3), <i>recA</i> (3'), Amp <sup>R</sup>	J. Püls
pJP109	pGEX4T-3, <i>cagY</i> RR1 (codons 1-325) ( <i>H. pylori</i> 26695)	J. Püls
pJP110	pGEX4T-3, <i>cagY</i> RR2 (codons 512-1442) ( <i>H. pylori</i> 26695)	J. Püls
pSO174	pBA, $\Delta$ hp543::cat	(87)
pRL1	pGEX4T-3, <i>cagA</i> ( <i>H. pylori</i> P12)	R. Laugks
pRL2	pHel2, <i>gfp-cagA</i> (codons 1164-1214)	R. Laugks
pRL3	pHel2, <i>gfp</i>	R. Laugks
pRL4	pHel2, <i>gfp-cagA</i> (codons 1114-1214)	R. Laugks
pRL5	pHel2, P <sub>cagA</sub> , <i>gsk-cagA</i> ( $\Delta$ 695-1019)	R. Laugks
pRL6	pHel2, P <sub>cagA</sub> , <i>gsk-cagA</i> ( $\Delta$ 783-1019)	R. Laugks
pWS130	pHel2, <i>gfp-cagA</i> (codons 614-1214)	(118)
pWS207	pHel2, P <sub>fla</sub> , <i>gfp-cagF</i>	W. Fischer
pWS214	pHel3, m45- <i>cagF</i>	W. Fischer
pWS226	pGEX4T-3, <i>cagF</i> ( <i>H. pylori</i> 26695)	W. Fischer
pWS228	pHel2, m45- <i>cagA</i> (codons 614-1214)	W. Fischer
pWS231	pHel2, <i>gsk-cagA</i> (codons 614-1214)	W. Fischer
pWS241	pJP99, P <sub>cagA</sub> , <i>cagA-m45</i>	W. Fischer
pWS251	pHel2, <i>gsk-cagA</i> (codons 1-1209) $\Delta$ 5C	W. Fischer
pWS252	pHel2, <i>gsk-cagA</i> (codons 1-1194) $\Delta$ 20C	W. Fischer
pWS253	pHel2, <i>gsk-cagA</i> (codons 1-1207) $\Delta$ 7C	W. Fischer
pWS254	pGEX4T-3, <i>cag<math>\beta</math></i> (codons 166-748) ( <i>H. pylori</i> 26695)	W. Fischer
pWS265	pHel2, <i>gsk-cagA</i> (P12/11637 <sup>FFFFF</sup> )	W. Fischer
pWS266	pHel2, <i>gsk-cagA</i> (P12/11637 <sup>YYYYY</sup> )	W. Fischer
pWS267	pHel2, <i>gsk-cagA</i> (P12/11637 <sup>FFYYY</sup> )	W. Fischer
pWS268	pHel2, <i>gsk-cagA</i> (P12/11637 <sup>YYFFF</sup> )	W. Fischer
pWS269	pHel2, P <sub>cagA</sub> , <i>gsk-cagA</i> ( $\Delta$ 868-1019)	W. Fischer
pWS270	pHel2, P <sub>cagA</sub> , <i>gsk-cagA</i> ( $\Delta$ 952-1019)	W. Fischer
pWS271	pHel2, <i>gsk-cagA</i> (codons 1-951)	W. Fischer
pWS272	pHel2, <i>gsk-cagA</i> (codons 1165-1214)	W. Fischer
pWS273	pHel2, <i>gfp-cagA</i> (codons 1019-1214)	W. Fischer
pWS274	pHel2, <i>gsk-cagA</i> (codons 1-868)	W. Fischer
pWS159-13	pJP99, P <sub>cagA</sub> , <i>cagA</i> (codons 1-1128) $\Delta$ 92C	W. Fischer

## 1.4 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Biomers (Ulm, D) bezogen. In Tab. 5 sind alle in dieser Arbeit beschriebenen Oligonukleotide mit Namen, Sequenz sowie die Bezeichnung der daraus resultierenden Plasmide aufgeführt.

**Tab. 5: Oligonukleotide**

Name	Gen <sup>a</sup>	Sequenz (5' → 3')	Verwendung
catseq	<i>cat gc</i>	CTGCAGGTCGATAAACCG	Sequenzierprimer
HK3	<i>cagA</i>	CGGGATCCGTCGACTTAAGATTTTGGAAACCAC	pRL1
IP6	<i>cagζ</i>	CGGGGTACCTCAATCTTTAGTCTC	pIP24, 58
IP10	<i>cagQ</i>	CCGGGTACCCTAGAGTCTTACTTGAGA	pIP25, 26
IP14	<i>cagP</i>	CCGGGTACCTAAGAACCAATTTTGCC	pIP27
IP16	<i>jhp470<sup>b</sup></i>	CGGGGTACCCTAAACATTGGTTTCC	pIP28
IP17	<i>cagζ</i>	CCGCTCGAGAGATCTAGCTGACACAAT	pIP24, 58
IP18	<i>cagQ</i>	CCGCTCGAGAGATCTACTTCCTACTAAAACACGC	pIP25
IP19	<i>cagQ</i>	CCGCTCGAGAGATCTAGGAAAAATTTTAGC	pIP26
IP20	<i>cagP</i>	CCGCTCGAGAGATCTAAAACGACCGATTAGC	pIP27
IP21	<i>jhp470<sup>b</sup></i>	CCGCTCGAGGGATCCAAGTCTAGCTACGA	pIP28
IP22	<i>jhp470<sup>b</sup></i>	CCGCTCGAGGGATCCATGAGTCTAGCTACGAG	pIP46
IP23	<i>jhp470<sup>b</sup></i>	CGGGGTACCTAAACATTGGTTTCC	pIP46
JP28	<i>cagA</i>	ACCGCTCGAGGGTAAAAATGTGAATCGT	pIP22
JP67	<i>cagA</i>	GGCCGAGCTCGGTACCTTAAGATTTTGGAAACCA C	pIP9, 17, 23, 39, 51, pRL2, 4
WS79	<i>gfp</i>	GTAGATCTAAGTAAAGGAGAAGAAGACTT	pIP40, 31
WS80	<i>gfp</i>	GGGGTACCTTATTTGTATAGTTCATC	pIP45, 31
WS158	<i>cagA</i>	CCATCGATGGTAAAAATGTGAATCGT	pWS274
WS177	<i>cagA</i>	GGGGTACCTTAACCTTTTGTATTAACATTC	pWS251
WS178	<i>cagA</i>	CTGGTACCTTACGCCAAGCAGTAATATCCT	pWS252
WS179	<i>cagA</i>	CGGGATCCTGAAAAATCTCTAAAGAAAC	pWS251-253, 265- 268
WS215	<i>cagF</i>	GAAGATCTTTTGC GCGAACAAAAATTA	pIP15
WS216	<i>cagF</i>	GGGGTACCTCAATCGTTACTTTTGTTT	pIP15
WS217	<i>cagS</i>	GAAGATCTCTTCTCAATGATTGCTG	pIP14
WS218	<i>cagS</i>	GGGGTACCTTACACTCCTTTTCTTTCA	pIP14
WS221	<i>cagF</i>	CGGGATCCAAACAAAGTTTGC GCGAAC	pWS226
WS222	<i>cagF</i>	ACCGCTCGAGTCAATCGTTACTTTTGTTT	pWS226
WS227	<i>cagA</i>	CGGGATCCTGATCAAAAACCAATC	pIP17
WS265	<i>cagA</i>	CAGGATCCGACTAACGAAACCATTAACC	pIP9, 35, 39, 51, pWS265-268

Name	Gen <sup>a</sup>	Sequenz (5' → 3')	Verwendung
WS274	<i>blaM</i>	GAAGATCTCCCCAATGCTTAATCAGTGAGGCACC	pIP18, 18a
WS275	<i>blaM</i>	ACCGCTCGAGCATATGCACCCAGAAACGCTGGTGA AAG	pIP18, 18a
WS281	<i>cagA</i>	CGGGTACCTTATGTATTAACATTCTTGATTG	pWS253
WS284	<i>cagA</i>	GCGGATCCTTAAGATTCTGCAAAAGAAGTTGTTG AGGCCTACCAGACATCAGATCTTTCTGAGCTTTTT CAC	pIP22
WS285	<i>cagA</i>	GAGGATCCTAAAAACGGCAGTGGCTTAGTC	pIP23
WS286	<i>cagF</i>	GGACTAGTTAGTAAGGAGTATTAATGAAAC	pIP31, 40, 47
WS287	<i>cagF</i>	GAAGATCTCCATCGTTACTTTTGTGTTTGATT	pIP31, 40, 47
WS291	<i>cagA</i>	GCGGTACCTTAGATTCCATGCTCTGCATTTTC	pIP35
WS294	<i>gfp</i>	AGGGACCATATGGCAGACAAACAAAAGAATGGAA TC	pIP45
WS295	<i>gfp</i>	GCGGTACCTTATGCCATGATGTATACATTGTG	pIP44, 40
WS297	<i>gfp</i>	GGACTAGTTTAAGAAGGAGATATACATATG	pIP44
WS315	<i>cagA</i>	CAGGATCCACTAACGAAACCATTAAACC	pRL1
WS316	<i>cagA</i>	GCGGATCCGTCGAAAAGTTTTAGAAAAG	pRL2
WS318	<i>cagA</i>	CGGGATCCGAAAAGTTTTAGAAAAG	pWS274
WS319	<i>cagA</i>	CGGGATCCAACCCTAGTCGGTAATGGG	pIP48
WS320	<i>cagA</i>	GGGGTACCTTAAGCCAATTTTGATTCCTTG	pIP48
WS321	<i>cagA</i>	GAAGATCTCATGCTAGCGCAAAAAAACCC	pRL4
WS327	<i>cagζ</i>	CCATCGATAAAAAATCTTTAAACATGTC	pIP56, 57
WS328	<i>cagζ</i>	ACCGCTCGAGCATATGATTACCTCCATACATAATG	pIP57
WS329	<i>cagζ</i>	CGGGTACCTTATGATTCTGCAAAAGAAGTAGTACG TGGCCTCCAGACATCTCGAGATCTTTAGTCTCTTT GGCTTC	pIP56

<sup>a</sup> Bezeichnung nach Censini *et al.* (45), <sup>b</sup> Bezeichnung nach Tomb *et al.* (235)

## 1.5 Antikörper

Alle in dieser Arbeit verwendeten primären und sekundären Antikörper sind in den Tabellen 6 und 7 aufgeführt.

**Tab.6: Primäre Antikörper**

Spezifität (α-)	Eigenschaften	Referenz, Hersteller
CagA/HP547 [AK257]	Polyklonales Antiserum gegen die C-terminale Hälfte des CagA-Proteins von <i>H. pylori</i> 185-44 (Kaninchen)	(163)
CagA/HP547 [AK268]	Polyklonales Antiserum gegen die N-terminale Hälfte des CagA-Proteins von <i>H. pylori</i> 185-44 (Kaninchen)	W. Fischer

Spezifität ( $\alpha$ -)	Eigenschaften	Referenz, Hersteller
RecA [AK263]	Polyklonales Antiserum gegen das RecA-Protein von <i>H. pylori</i> P1 (Kaninchen)	(86)
CagS/HP534	Polyklonales Antiserum gegen das Protein HP534 von <i>H. pylori</i> 26659 (Kaninchen)	R. Buhrdorf
CagF/HP543 [AK284]	Polyklonales Antiserum gegen das Protein HP543 von <i>H. pylori</i> 26659 (Kaninchen)	W. Fischer
AlpB/HP1243 [AK 262]	Polyklonales Antiserum gegen ein AlpB-Fusionsprotein (HP1243) von <i>H. pylori</i> 26659 (Kaninchen)	S. Odenbreit
Cag $\alpha$ /HP525	Polyklonales Antiserum gegen das Protein HP525 von <i>H. pylori</i> (Kaninchen)	R. Buhrdorf
CagY/HP527 [AK273]	Polyklonales Antiserum gegen das Protein HP527 (AA 351-1311) von <i>H. pylori</i> J99 (Kaninchen)	(190)
CagX/HP528	Polyklonales Antiserum gegen das Protein HP528 (AA 37-522) von <i>H. pylori</i> J99 (Kaninchen)	R. Buhrdorf
CagT/HP532 [AK270]	Polyklonales Antiserum gegen das Protein HP532 von <i>H. pylori</i> (Kaninchen)	(190)
IL-8 [G265-5]	Monoklonaler Antikörper (IgG2b) gegen humanes Interleukin 8 (Maus)	Pharmingen
GSK-3 $\beta$	Polyklonales Antiserum gegen die Glycogen-Synthase-Kinase 3 (Kaninchen)	Cell Signaling Technology
P-GSK-3 $\beta$	Polyklonales Antiserum gegen die Glycogen-Synthase-Kinase 3, phosphoryliert am Serin 9 (Kaninchen)	Cell Signaling Technology
P-Tyr [PY99]	Monoklonaler Antikörper gegen tyrosinphosphorylierte Proteine (Maus)	Santa Cruz Biotechnology
GFP	Polyklonaler Antikörper gegen die N-terminale Hälfte des Green Fluorescent Proteins (AA 3-17) (Kaninchen)	Sigma-Aldrich
GST [GST-2]	Monoklonaler Antikörper gegen die Glutathione-S-Transferase (Maus)	Sigma-Aldrich
M45	Polyklonaler Antikörper gegen das m45-Epitop des adenoviralen E4-6/7 Proteins (Maus)	(162)
ComB8	Polyklonales Antiserum gegen das Protein ComB8 von <i>H. pylori</i> (Kaninchen)	(117)

Tab.7: Sekundäre Antikörper

Spezifität ( $\alpha$ -)	Eigenschaften	Referenz, Hersteller
Maus IgG-POX	Meerrettichperoxidase (POX)-gekoppelter polyklonaler Antikörper gegen Maus-IgG (Kaninchen)	Dianova
Maus IgG-POX	Meerrettichperoxidase (POX)-gekoppelter polyklonaler Antikörper gegen Maus-IgG (Ziege)	Sigma-Aldrich
Kaninchen IgG-POX	Meerrettichperoxidase (POX)-gekoppelter polyklonaler Antikörper gegen Kaninchen-IgG (Ziege)	Dianova, Sigma-Aldrich
Maus IgG-AP	Alkalische Phosphatase (AP)-gekoppelter polyklonaler Antikörper gegen Maus-IgG (Ziege)	Sigma-Aldrich
Maus Alexa Fluor 488 <sup>®</sup>	Alexa 488-gekoppeltes F(ab') <sub>2</sub> Fragment gegen Maus-IgG (Ziege)	Molecular Probes
Kaninchen Alexa Fluor 555 <sup>®</sup>	Alexa 555-gekoppelter Antikörper gegen Kaninchen-IgG (Ziege)	Molecular Probes

## 1.6 Enzyme und Proteine

Proteine	Alkalische Phosphatase (AP)-gekoppeltes Protein A (Sigma-Aldrich, St. Luis, USA) Rinderserumalbumin (BSA) (Biomol) Fetales Kälberserum (FCS) (Gibco/Invitrogen) Pferdeserum (PAA) Protein G-Agarose (Roche Applied Science, Mannheim, D) Glutathione Sepharose (Amersham Biosciences)
Enzyme	Restriktionsenzyme (Roche Applied Science) Expand High Fidelity <i>Taq</i> Polymerase (Roche Applied Science) T4-DNA-Ligase (Roche Applied Science) TaKaRa LA <sup>®</sup> <i>Taq</i> -Polymerase (Takara Bio Inc.) Thrombin (Amersham Biosciences) RNase (Qiagen)

## 1.7 Molekulargewichtsmarker

DNA-Gelelektrophorese	GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (MBI Fermentas) GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (MBI Fermentas)
Polyacrylamid-Gelelektrophorese	Prestained High Range (Bio-Rad, 161-0373) Prestained Protein Molecular Weight Marker (MBI Fermentas, SM0441) Prestained Ultra-Low Range (Sigma-Aldrich, M3546)



## 1.8 Zellkulturmedien und -puffer

Alle Zellkulturmedien und Puffer wurden von Gibco/Invitrogen (Carlsbad, USA) bezogen.

PBS	PBS Dulbecco's ohne Calcium, Magnesium und Natriumbicarbonat
RPMI	RPMI 1640 Medium mit L-Glutamin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium mit Natriumpyruvat und Pyridoxin
TE	Trypsin/EDTA (10 x)

Zusätze für Zellkulturmedien: 4 x Penicillin/Streptomycin, L-Glutamin 200 mM (100 x), Fetales Kälberserum (FCS).

## 1.9 Nährmedien für Bakterien

Für die Herstellung aller Nährmedien wurde entsalztes und filtriertes Wasser aus einer Reinstwasseranlage (Memtech, Moerenweis, D) verwendet. Alle Nährmedien wurden in Wasserdampfhochdruckautoklaven Sterimaquet™ (Maquet/Geringe, Rastatt, D) für 20 min bei 121°C und  $1,013 \times 10^5$  Pascal Überdruck sterilisiert. Hitzelabile Substanzen wie Antibiotika und Vitamine wurden sterilfiltriert (Sterilfilter 0,2 µm Porengröße) und den jeweiligen Nährmedien nach dem Autoklavieren bei max. 55°C Medientemperatur aseptisch zugegeben.

LB-Flüssigmedium	20 g/l Lennox-L-Medium (Gibco/Invitrogen), autoklaviert
LB-Platten	32 g/l Lennox-L-Agar (Gibco/Invitrogen), autoklaviert
Brucella-Medium	28 g/l Brucella Broth (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA), autoklaviert
Serumplatten	36 g/l GC-Agar-Base (Remel), autoklaviert, danach Zugabe von 10 ml/l Vitamin-Mix, 80 ml/l Pferdeserum, 10 mg/l Vancomycin, 5 mg/l Trimethoprin, 1 mg/l Nystatin
Vitaminmix	100 g/l α-D-Glucose, 10 g/l L-Glutamin, 26 g/l L-Cystein, 0,1 g/l Cocarboxylase, 20 mg/l Fe(III)-Nitrat, 3 mg/l Thiamin, 13 mg/l p-Aminobenzoesäure, 0,25 g/l Nicotinamid-adeninindinucleotid (NAD), 10 mg/l Vitamin B12, 1,1 g/l L-Cystin, 1 g/l Adenin, 30 mg/l Guanin, 0,15 g/l L-Arginin, 0,5 g/l Uracil

## 1.10 Antibiotika und andere Zusätze

Chloramphenicol und Nystatin wurden von Merck (Darmstadt, D), alle weiteren Antibiotika und Zusätze von Sigma-Aldrich (St. Luis, USA) bezogen.

**Tab. 8: Hemmstoffe und Medienzusätze**

Medienzusätze	Abkürzung	Lösungsmittel	Arbeitskonzentration
Ampicillin	Amp	H <sub>2</sub> O	100 mg/l
Streptomycin	Strep	H <sub>2</sub> O	50 mg/l
Chloramphenicol	Cam	EtOH	30 mg/l (LB-Medium/-Platten) 6 mg/l (Serum-Platten)
Kanamycin	Kan	H <sub>2</sub> O	50 mg/l (LB-Medium/-Platten) 8 mg/l (Serum-Platten)
Vancomycin	-	H <sub>2</sub> O	10 mg/l (Serum-Platten)
Trimetoprin	-	H <sub>2</sub> O	5 mg/l (Serum-Platten)
Nystatin	-	DMF	1 mg/l (Serum-Platten)
Diaminopimelinsäure	DAP	H <sub>2</sub> O	14 mg/l (LB-Platten)
Isopropyl-beta-D-Thiogalactopyranosid	IPTG	H <sub>2</sub> O	200 µM

## 1.11 Lösungen und Puffer

Für die Herstellung aller Lösungen und Puffer wurde entsalztes und filtriertes Wasser aus einer Reinstwasseranlage (Memtech, Moerenweis, D) verwendet.

Alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten Standardpuffer und Lösungen sind im Folgenden aufgelistet. Spezielle Reagenzien und Puffer sind bei den entsprechenden Methoden gesondert aufgeführt. Die pH-Werte wurden, soweit nicht anders angegeben, mit NaOH bzw. HCl entsprechender Normalitäten eingestellt.

10 x PBS	2 g/l KCl, 80 g/l NaCl, 2 g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 14,4 g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
1 x PBS	10 % (v/v) 10 x PBS in H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>
TBS	150 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl pH 7,5
2 x SDS-Probenpuffer	2 % SDS, 0.1 % Bromphenolblau, 10 % Glycerin, 50 mM TrisHCl pH 6,8
20 % SDS-Lösung	200 g/l SDS, H <sub>2</sub> O auf 65°C anwärmen

## 1.12 Chemikalien

Die wichtigsten Chemikalien sind in Tab. 9 aufgeführt und wurden in p.a. Qualität verwendet. Alle weiteren Chemikalien wurden im selben Reinheitsgrad von Merck (Darmstadt, D), Roth (Karlsruhe, D) oder Sigma-Aldrich (St. Luis, USA) bezogen. Spezielle Reagenzien sind bei den entsprechenden Methoden aufgeführt.

**Tab. 9: Chemikalien**

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
Acrylamid/Methylenbisacrylamid 29:1 (30 %)	Roth
Agarose	Sigma-Aldrich
5-Brom-3-chlor-indolylphosphat-p-Toluidinsalz (BCIP)	Roth
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg, D
Coomassie Brilliant Blue R250	Biomol, Hamburg, D
Desoxyribonukleinsäure-(dNTP-) Mix	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, D
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich
Fluoroprep®	BioMerieux, Marcy-l'Etoile, F
Leupeptin	Sigma-Aldrich
Methylenblau	Sigma-Aldrich
Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS)	Pharmacia
Natrium-Orthovanadat	Roth
Sephadex G-50	Pharmacia
Nitrotetrazoliumblauchlorid (NBT)	Roth
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich
Pepstatin A	Sigma-Aldrich
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Merck
N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamid (TEMED)	Sigma-Aldrich
Triton X-100	Sigma-Aldrich
Tween 20	Sigma-Aldrich

### 1.13 Verbrauchsmaterialien und Hilfsmittel

Tab. 10: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
ELISA Maxisorp Platten	Nunc, Wiesbaden, D
Einfrierröhrchen 1,5 ml	Nalgene/Nalge Nunc, Wiesbaden, D
Falcon Röhrchen 15 ml, 50 ml	Falcon, BD, Franklin Lakes, USA
Filterpapiere Whatman®	Whatman, Brentford, UK
Nitrocellulose-Filter	Millipore, Billerica, USA
Petrischalen	Greiner, Kremsmünster, A
Einmalpipetten und -spitzen	Gilson, Middleton, USA
PVDF-Membran	BioRad, Hercules, USA
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf, Hamburg, D
Einmal-Spritzen Omnifix® 50 ml, 25 ml, 5 ml	Braun, Melsungen, D
Röntgenfilme Super RX	Fuji Film, Düsseldorf, D
Sterilfilter 0,2 µm	Josef Peske GmbH, Aindling, D
Zellkulturschalen und -flaschen	Nunc, Wiesbaden, D
Zellschaber	Falcon, BD, Franklin Lakes, USA

### 1.14 Geräte und Apparaturen

Tab. 11: Geräte und Apparaturen

Gerät	Hersteller
Anaerobenbrutschrank Microincubator MI22C	Scholzen, Wittenbach, CH
Anaerobiertöpfe	Fritz Gößner GmbH, Hamburg, D
Agarose-Gelkammern Wide Mini-Sub® cell	BioRad, Hercules, USA
Blot-Apparaturen <i>semi-dry</i>	Biotech Fischer, Reiskirchen, D
Brutschränke FED	Binder, Tuttlingen, D
Elektroporationsgerät Gene Pulser™	BioRad, Hercules, USA
ELISA-Reader GENios	Tecan, Oxford, PA
French Press SIM-AMINCO	Spectronic Instruments, Rochester, USA
Geldokumentationssystem Quantity One 4.4.0	BioRad, Hercules, USA
Magnetrührer mit Heizung MR 3001	Heidolph, Schwabach, D
Mikroskope:	
Fluoreszenzmikroskop Leitz DM RBE mit Digitalkamera	Leica, Mannheim, D
Konfokales Mikroskop Leica DM IRB	Leica, Mannheim, D

Gerät	Hersteller
PAGE-Mini Gelkammern	BioRad, Hercules, USA
pH-Meter ProfiLine pH 197i	WTW, Weilheim, D
Photometer DR/2000	Hach, Bremen, D
SMART®-Anlage	Amersham Biosciences, Freiburg, D
Schüttelinkubatoren Certomat R BS-1	Braun Biotech/Sartorius BBI Systems, Göttingen, D
Spannungsquellen Power Pac 300	BioRad, Hercules, USA
Spektralphotometer Ultrospec™ 3100pro	Amersham/Biosciences, Freiburg, D
Sterilbank	BDK Luft-und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl-Genkingen
Thermocycler Microcycler Personal	Eppendorf Perkin Elmer, Wellesley, USA
Ultraschallgerät Sonifier II 450	G. Heinemann, Ultraschall- u. Laborgeräte, Schwäbisch Gmünd, D
Vortex Gene 2	Scientific Industries
Wasserbäder 1012	GFL, Burgwedel, D
Zentrifugen:	
Zentrifuge RC5C Plus (Rotoren SS34, SLA3000)	Sorvall, Langenselbold, D Heraeus, Hanau, D
Tischzentrifugen Megafuge 1.0R, Biofuge 15R, Biofuge 15	Beckman Coulter Inc., Fullerton, USA
Ultrazentrifuge Optima™ TL (Rotoren TLA45, TLA1003)	GMI, Ramsey, USA
Vakuumbzentrifuge Savant SpeedVac DNA 110	

## 2 Methoden

### 2.1 Arbeiten mit Bakterien

#### 2.1.1 Kultivierung und Stammhaltung von Bakterien

##### *Escherichia coli*

*Escherichia coli* wurde bei 37°C auf Luria-Bertani (LB)-Platten kultiviert, die bei Bedarf Antibiotika enthielten. Die Anzucht von Flüssigkulturen fand entsprechend in LB-Flüssigmedium statt. Für Expressionsexperimente wurden Temperaturen von 24°C bis 37°C eingesetzt.

Zur Stammhaltung wurden Glycerinkulturen angelegt. Dazu wurde eine Einzelkolonie auf ½ Agarplatte ausgebracht und das Koloniematerial nach ca. 14 h Wachstum in 1 ml Einfriermedium (LB mit 20 % Glycerin) suspendiert und bei -70°C eingefroren.

##### *Yersinia enterocolitica*

Die Kultivierung und Stammhaltung von *Yersinia enterocolitica* erfolgte unter den gleichen Bedingungen und auf den gleichen Nährmedien wie *Escherichia coli*.

##### *Helicobacter pylori*

*Helicobacter pylori* wurde auf Serumplatten oder gegebenenfalls auf antibiotikahaltigen Serum-Selektivplatten unter mikroaerophilen Bedingungen (5 % O<sub>2</sub>, 10 % CO<sub>2</sub>, 85 % N<sub>2</sub>) bei 37°C inkubiert. Flüssigkulturen wurden in Brucella-Medium, supplementiert mit 10 % FCS bei 80 rpm in einem Anaerobiertopf im Rundschüttler (80 rpm) angezogen.

Für die Stammhaltung wurde Zellmaterial einer halben bewachsenen Serumplatte in 1 ml Brucella-Medium mit 20 % Glycerin und 10 % FCS suspendiert und bei -70°C eingefroren. Zur Rekultivierung wurden aus der Gefrierkultur *H. pylori*-Stämme auf Serumplatten ausgestrichen und 48 h bei 37°C bebrütet. Nach ein- bis zweimaligem Passagieren auf neue Platten wurden die Bakterien für Experimente verwendet.

### 2.1.2 Herstellung chemokompetenter *E. coli*-Zellen

Die Herstellung chemokompetenter Zellen erfolgte nach der Rubidium-Chlorid-Methode (107). Dazu wurden 100 ml LB-Medium mit 5 ml einer Übernachtskultur *E. coli* angeimpft und bis zu einer OD<sub>550</sub> von 0,5 - 0,6 bei 37°C, 200 rpm im Schüttler inkubiert. Die Zellen wurden auf Eis gekühlt und durch Zentrifugation (2300 x g, 15 min, 4°C) sedimentiert. Nach dem Resuspendieren des Zellpellets in 20 ml TFB I und anschließender Inkubation auf Eis für 5 min wurde erneut zentrifugiert. Abschließend konnten die Zellen in TFB II resuspendiert und nach 15 minütiger Inkubation auf Eis in 50 µl Aliquots schockgefroren und bei -70°C gelagert werden.

TFB I	30 mM Kaliumacetat, 100 mM RbCl, 10 mM CaCl <sub>2</sub> , 50 mM MnCl <sub>2</sub> , 15 % (v/v) Glycerin; pH 5,2 mit 0,2 M Essigsäure eingestellt; sterilfiltriert
TFB II	10 mM MOPS, 75 mM CaCl <sub>2</sub> , 10 mM RbCl; 15 % (v/v) Glycerin; pH 6,5 mit KOH eingestellt; sterilfiltriert

### 2.1.3 Herstellung elektrokompeter *E. coli*-Zellen

Zur Herstellung elektrokompeter *E. coli*-Zellen wurden 0,5 l LB-Medium mit 5 ml einer über Nacht gewachsenen *E. coli*-Kultur angeimpft und bei 37°C bis zum Erreichen einer OD<sub>550</sub> von 0,6-0,8 unter Schütteln inkubiert. Die Bakterien wurden 15 min auf Eis gekühlt und abzentrifugiert (4°C, 2000 x g, 10 min). Das Sediment wurde in 500 ml eiskaltem H<sub>2</sub>O resuspendiert und nochmals zentrifugiert. Nach erneutem Waschen des Bakteriensediments in 20 ml eiskalter 10 %-iger Glycerinlösung wurden die Zellen schließlich in 2 ml 10 %-iger Glycerinlösung aufgenommen und in 50 µl Aliquots bei -70°C eingefroren.

#### **2.1.4 Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen**

Zur chemischen Transformation von *E. coli*-Zellen wurde ein Aliquot kompetenter Zellen auf Eis aufgetaut, 3-5 µl Ligationsansatz bzw. 1-2 µl Plasmid-DNA zugegeben und 15 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen einem Hitzeschock (30 s bei 42°C) unterzogen und anschließend zur Regeneration 2 min auf Eis inkubiert. Dem Transformationsansatz wurden 400 µl LB-Medium zugegeben und zur Ausbildung der Antibiotikaresistenz 1 h bei 37°C geschüttelt. Geeignete Aliquots des Ansatzes wurden auf LB-Selektivplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

#### **2.1.5 Elektrotransformation von *E. coli*-Zellen**

Ein Aliquot elektrokompetenter Zellen wurde auf Eis aufgetaut und mit 0,2-1 µg Plasmid-DNA (max. 1,5 µl) vermengt. Das Gemisch wurde in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (Elektrodenabstand 3 mm) pipettiert. Die Elektroporation erfolgte mittels der Gene pulser™-Apparatur (BioRad) bei 25 µF und einem Widerstand von 200 Ω. Im Anschluss wurde der Küvetteninhalt in 1 ml vorgewärmtes LB-Medium transferiert und zur Expression der Antibiotikaresistenz 1 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden geeignete Aliquots auf LB-Selektionsplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

#### **2.1.6 Transformation von *H. pylori***

*H. pylori* verfügt über eine natürliche Transformationskompetenz (104), weshalb keine Vorbehandlung der Bakterien notwendig war. Zur Transformation wurden die Bakterien in Brucella-Medium mit 10 % FCS suspendiert und auf eine OD<sub>550</sub> von ca. 0,2 eingestellt. 1 ml dieser Suspension wurde ½ h bei 37°C unter 10 % CO<sub>2</sub> vorinkubiert und nach Zugabe von 1-3 µg DNA weitere 4-5 h stengelassen. Der Transformationsansatz wurde auf entsprechende Serum-Selektivplatten ausplattiert und unter Standardbedingungen 4-6 Tage inkubiert.



### 2.1.7 Konjugation von *H. pylori* (111)

Schwer transformierbare „Shuttle-Vektoren“ (sowohl in *E. coli* als auch in *H. pylori* replizierbar) wurden mittels Konjugation von dem *E. coli*-Donorstamm  $\beta$ 2155 auf den *H. pylori*-Akzeptorstamm P76 übertragen. Dazu wurde der mit dem Zielploid transformierte Donorstamm sowie der Akzeptorstamm auf geeigneten LB (DAP) - bzw. Serumplatten ausgestrichen und über Nacht unter Standardbedingungen inkubiert. Beide Stämme wurden in Brucella-Medium suspendiert, die OD<sub>550</sub> bestimmt, um anschließend Donor- zu Akzeptorstamm im Verhältnis 1:10 in einem Gesamtvolumen von 40  $\mu$ l Brucella mit 10 % FCS zu mischen. Die Bakteriensuspension wurde auf Serumplatten mit aufgelegten Nitrozellulosefiltern pipettiert. Die Inkubation erfolgte 4 h bei 37°C unter 10 % CO<sub>2</sub>. Im Anschluss wurde der Ansatz mit 1 ml Brucella-Medium abgespült, auf Serum-Selektivplatten ausplattiert und unter Standardbedingungen 4-6 Tage inkubiert.

Der *E. coli*-Donorstamm  $\beta$ 2155 ist durch die Defizienz im Gen der DAP-Aminotransferase ( $\Delta$ dapA::erm) auxotroph für Diaminopimelinsäure und benötigt für die Lysin Biosynthese den Zusatz von DAP. Aufgrund dessen können nur *H. pylori*-Transkonjuganden auf Serum-Selektivplatten wachsen.

### 2.1.8 Bestimmung der optischen Dichte von Bakterien

Die Bestimmung der optischen Dichte (OD) einer Bakteriensuspension erfolgte in Kunststoffküvetten in einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 550$  nm (OD<sub>550</sub>). Dazu wurden Bakterien entweder von Platte abgenommen und im gewünschten Medium bzw. PBS resuspendiert, oder es wurde ein Aliquot aus einer Flüssigkultur entnommen. Nach entsprechender Verdünnung, falls notwendig, fand die Bestimmung der optischen Dichte gegen den jeweiligen Blindwert statt.

## 2.1.9 Zellsubfraktionierung von *H. pylori*

### 2.1.9.1 Osmotischer Schock und Proteasebehandlung

Wenn Bakterien in eine Umgebung mit hoher Zuckerkonzentration gebracht werden, verlieren sie aufgrund von Osmose passiv Wasser. Werden diese Zellen anschließend in destilliertem Wasser inkubiert, kommt es zur schnellen Diffusion von Wasser in die Zelle und die äußere Membran platzt. Dadurch werden Proteine im periplasmatischen Raum zugänglich, während cytoplasmatische Moleküle im Protoplasten durch die innere Membran geschützt sind. Um eine grobe Aussage über die Lokalisation von Proteinen auf der Zelloberfläche, im Periplasma bzw. im Cytoplasma treffen zu können, wurden unbehandelte sowie schockbehandelte *H. pylori*-Zellen einer Trypsinbehandlung unterzogen. Ein Abbau durch die Protease gibt Hinweise auf die Lokalisation des untersuchten Proteins.

Zellmaterial einer gut bewachsenen Platte wurde in 1 ml 10 mM TrisHCl (pH 8,0) gewaschen und bei 4000 x g 5 min lang zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml 25 % (w/v) Saccharose, 10 mM EDTA resuspendiert und bei Raumtemperatur 10 min inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und das Pellet in 1 ml eiskaltem destilliertem Wasser resuspendiert. Nach 10 min auf Eis und einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde der Überstand steriltriftriert und der Niederschlag in PBS resuspendiert. Zur Proteasebehandlung wurde eine OD<sub>550</sub> von 5 in 100 µl eingestellt und mit der gewünschten Menge an Trypsin 10 min bei RT inkubiert. Die Analyse erfolgte mittels SDS-PAGE und Western Blot.

### 2.1.9.2 Präparation der Gesamtmembranfraktion und NaCl-Extraktion

Eine NaCl-Extraktion gibt Hinweise auf eine periphere Lokalisation von membranassoziierten Proteinen, die dadurch von integralen Membranproteinen unterschieden werden können. Zur Präparation der Gesamtmembranfraktion wurde Koloniematerial von 5-10 Serumplatten abgenommen bzw. eine 200 ml Flüssigkultur verwendet. Das Bakterienmaterial wurde pelletiert und in entsprechendem Lysepuffer aufgenommen.

Der Zellaufschluss erfolgte mit Ultraschall auf Eis oder mittels French Press (4 x 8000 psi). Nicht aufgeschlossene Zellen wurden bei 10000 x g (10 min) abgetrennt. Durch Ultrazentrifugation bei 100000 x g für 60 min wurde die lösliche Zellfraktion von der Membranfraktion abgetrennt.

Zur NaCl-Extraktion wurde die Gesamtmembranfraktion 30 min mit 1 M NaCl-Lösung inkubiert. Die Analyse der erhaltenen Fraktionen erfolgte mittels SDS-PAGE und Western Blot.

### 2.1.9.3 Triton X-100 Löslichkeit

Diese Methode beruht auf der Beobachtung, dass Proteine der äußeren Membran nicht durch Inkubation mit dem Detergenz Triton X-100 in Lösung gebracht werden können (201).

Für diese Proteinfractionierungsversuche wurden 200 ml einer 2-Tages Flüssigkultur des *Helicobacter pylori*-Stammes P12 bei 4000 x g, 20 min pelletiert, die Zellen in 5 ml Lysepuffer resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Zellaufbruch mittels French Press bei 4 x 8000 psi. Durch Zentrifugation des Zelllysates bei 10000 x g, 10 min wurden ganze, nicht aufgeschlossene Zellen abgetrennt. Der resultierende Überstand wurde als Ausgangsmaterial für die Fraktionierung eingesetzt. Ein Ultrazentrifugationsschritt (60 min bei 100000 x g) diente zur Abtrennung der löslichen Fraktion von der Membranfraktion.

Das Membranpellet wurde in 1 ml Extraktionspuffer resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Durch erneute Ultrazentrifugation (60 min, 100000 x g) konnten Triton X-100 lösliche von unlöslichen Proteinen abgetrennt werden. Die einzelnen Fraktionen wurden im entsprechenden Verhältnis auf SDS-PAGE aufgetragen und aufgetrennt. Der Nachweis einzelner Proteine erfolgte über Western Blot und Immundetektion.

Lysepuffer	50 mM Tris, pH 8 Lysozym 0,2 mg/ml mit Proteaseinhibitoren (PMSF, Leupeptin, Pepstatin)
Extraktionspuffer	50 mM Tris, pH 8 20 mM MgSO <sub>4</sub> 1 % (v/v) Triton X-100

## **2.2 Arbeiten mit Zellkulturen**

### **2.2.1 Kultivierung von Zelllinien**

#### **Kultur von AGS-, St3051- und HeLa-Zellen**

AGS- und St3051-Zellen wurden in RPMI-Medium mit 10 % FCS kultiviert, HeLa-Zellen in DMEM, supplementiert mit 10 % FCS und Glutamin. Die Zellen wurden in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen bei 37°C unter 5 % CO<sub>2</sub> in wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert und vor Bildung eines konfluenten Rasens verdünnt. Dazu wurde einmal mit PBS gewaschen und die Zellen mit 3 ml Trypsinlösung behandelt. Das Ablösen der Zellen nach einigen Minuten wurde mikroskopisch kontrolliert und das Trypsin durch Zugabe von 5 ml Medium mit FCS inaktiviert. Anschließend wurde ein Teil der Zellen in eine neue Zellkulturflasche mit Medium umgesetzt.

#### **Kultur von THP-1 und Jurkat**

Die Kultivierung von THP-1-Zellen erfolgte in RPMI-Medium mit 10 % FCS bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>. Die Suspensionszellen wurden alle 3 Tage im Verhältnis 1:4 verdünnt. Dazu wurden die Zellen zur Entfernung des alten Mediums und nach einem Waschschrift in PBS 5 min bei 200 x g abzentrifugiert.

### **Kultur von J774A.1-Macrophagen**

Die adhärente Maus-Makrophagen-Zelllinie J774A.1 wurde in DMEM-Medium mit 10 % FCS bei 37°C und 10 % CO<sub>2</sub> in wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert. Von einer nahezu konfluent gewachsenen Kultur wurde das Medium abgesaugt und der Zellrasen einmal mit PBS gewaschen, um Mediumreste und abgelöste Zellen zu entfernen. J774A.1-Zellen halten einer Trypsin-Behandlung nicht stand, weshalb die Zellen mit einem sterilen Zellschaber in DMEM-Medium abgeschabt wurden. Die Passage erfolgt alle 3 Tage, wobei die Zellen 1:6 in 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen verdünnt wurden.

### **2.2.2 Auftauen und Einfrieren von Zelllinien**

#### **Auftauen**

Die in Kryoampullen bei -180°C aufbewahrten Zellen wurden aus dem Stickstoff entnommen und zunächst auf Eis transportiert. Anschließend wurden die Zellen im Wasserbad bei 37°C zügig aufgetaut und in 10 ml vorbereitetes, der Zelllinie entsprechendes, Medium mit 10 % FCS überführt. Danach wurde 5 min bei 200 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen über Nacht in Zellkulturmedium, supplementiert mit 15 % FCS, kultiviert. Die Vitalität und Dichte der Zellen wurde am nächsten Tag überprüft und diese, falls erforderlich, verdünnt.

#### **Einfrieren**

Die Zellen einer konfluent bewachsenen 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche wurden in zwei Kryoröhrchen eingefroren. Dazu wurden die Einfrierröhrchen auf Eis gekühlt, die Zellen mit Hilfe von Trypsin bzw. einem Zellschaber in Suspension gebracht und 10 min bei 200 x g abzentrifugiert. Das 1-2 x in 5 ml Medium gewaschene Zellpellet wurde auf Eis in 1,5 ml gekühltem Medium mit 20 % FCS resuspendiert. Anschließend wurde tropfenweise die gleiche Menge Einfriermedium zugegeben und in 1,5 ml Aliquots je Kryogefäß portioniert. Das Einfrieren erfolgte erst bei -70°C für 24 h, anschließend die dauerhafte Lagerung in flüssigem Stickstoff.

Einfriermedium

DMEM oder RPMI, 20 % FCS, 15 % DMSO, sterilfiltriert

### 2.2.3 Zellzahlbestimmung mit der Neubauer-Zählkammer

Die Bestimmung der Zellzahl einer Zellsuspension erfolgte mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer. Dazu wurde ein Aliquot in die Zählkammer pipettiert und die Zellen in vier Quadranten der Kammer ausgezählt. Aus dem gebildeten Mittelwert wurde die Zellzahl pro ml nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{Mittelwert} * \text{Verdünnungsfaktor} * 10^4$$

### 2.2.4 Transfektion von AGS-Zellen

Zur Transfektion von Plasmiden in AGS-Zellen wurde das Transfektionsreagenz Fugene™ oder Fugene HD (Roche Applied Science) eingesetzt. Exponentiell wachsende AGS-Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und entsprechend ausgesät, so dass die Zellen zum Zeitpunkt der Transfektion 50-60 % konfluent waren. Die Durchführung der Transfektion erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Effizienz wurde mit Hilfe von GFP-Expressionsvektoren (z. B. pEGFP, Clontech) fluoreszenzmikroskopisch überprüft.

Die nach der Transfektion für mikroskopische Untersuchungen verwendeten Zellen, wurden mind. 4 h vor dem Transfizieren auf Glasdeckgläschen ausgesät.

### 2.2.5 Infektionsexperimente mit *H. pylori*:

#### Phosphotyrosin- und Phospho-GSK-Assay

Zum Nachweis der Translokation von Effektorproteinen wurden  $1 \cdot 10^6$  Zellen für vier Stunden mit *H. pylori* mit einer MOI 100 infiziert. Bei längeren Infektionszeiten (7 h oder über Nacht) wurde die MOI auf 50 reduziert, um ein Überwachsen der Zellen zu verhindern. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und adhärente Zellen in 1 ml PBS\* mit einem Zellschaber abgeschabt bzw. Suspensionszellen in 1 ml PBS\* resuspendiert. Durch Zentrifugation (5 min, 400 x g) wurden die Zellen sedimentiert und anschließend in 25 µl PBS\* und 30 µl 2x SDS-Probenpuffer aufgenommen. Nach Inkubation der Lysate für 5 min bei 96°C, wurden die Proben über SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot analysiert.

Zur Bestätigung einer Tyrosin-Phosphorylierung wurde PBS\*, zum Nachweis einer GSK-Phosphorylierung PBS\*\* eingesetzt. PBS\* enthält neben den Proteaseinhibitoren PMSF (Serinproteasen), Leupeptin (Serin- und Cysteinproteasen) und Pepstatin A (Aspartatproteasen) den Tyrosinphosphataseinhibitor Na-Vanadat, welcher in PBS\*\* durch einen Serin- und Threonin-spezifischen Phosphatase-Inhibitor-Cocktail ersetzt wurde.

PBS*	PBS, 1 mM EDTA, 1 mM Na-Vanadat, 1 mM PMSF, 1 µM Leupeptin, 1 µM Pepstatin
PBS**	PBS, 1 mM EDTA, Phosphatase-Inhibitor-Cocktail 1 (Sigma-Aldrich), 1 mM PMSF, 1 µM Leupeptin, 1 µM Pepstatin

### 2.2.6 Messung der IL-8 Produktion von AGS-Zellen mittels Sandwich-ELISA

Durch ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) können geringe Mengen an Proteinen mittels spezifischer Antikörper bestimmt werden. Im Sandwich-ELISA wird ein so genannter „Fangantikörper“, welcher das entsprechende Antigen, hier IL-8, in einer komplexen Proteinlösung binden kann, in den Näpfen einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Die Detektion erfolgt über einen direkt oder indirekt markierten Sekundärantikörper, der gegen ein anderes Antigenepitop als der Fangantikörper gerichtet ist.

AGS-Zellen wurden mit *H. pylori*-Stämmen (MOI 100) infiziert. Bevor die Zellen abgeschabt wurden, wurde ein Aliquot des Kulturüberstandes abgenommen und bei 4000 x g, 10 min zentrifugiert, um ganze Zellen und Bakterien abzutrennen. Der resultierende Überstand wurde zur Quantifizierung von IL-8 mittels Sandwich-ELISA eingesetzt. Die Bestimmung der IL-8 Konzentrationen in den Zellkulturüberständen erfolgte mit dem OptEIA™ Human IL-8 Set von Pharmingen (BD Biosciences Pharmingen) nach Anleitung des Herstellers.

## 2.3 Arbeiten mit Nukleinsäuren

### 2.3.1 Quanti- und qualitative Analyse von DNA

Zur quantitativen Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäurelösungen (55) wurde ein geeignetes Aliquot mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$  verdünnt (meist 1:50) und in einem Spektralphotometer (Ultraspec™ 3100 pro, Amersham Biosciences) vermessen. Für die Konzentrationsberechnungen gilt bei einer Schichtdicke von 1 cm in Näherung folgender Zusammenhang (66):

doppelsträngige (ds) DNA	$\text{OD}_{260} = 1 \approx 50 \mu\text{g ds DNA/ml}$
einzelsträngige (ss) DNA	$\text{OD}_{260} = 1 \approx 31 \mu\text{g ss DNA/ml}$

Verunreinigungen können durch Bestimmung der Extinktionen bei 230, 260 und 280 nm bestimmt werden, indem die Quotienten  $\text{E}_{260}/\text{E}_{280}$  und  $\text{E}_{260}/\text{E}_{230}$  gebildet werden. Eine ausreichende Reinheit der isolierten Nukleinsäuren kann bei folgenden Richtwerten (147,195) angenommen werden:

$$\begin{aligned}\text{E}_{260}/\text{E}_{280} &\geq 1,8 \\ \text{E}_{260}/\text{E}_{230} &\geq 2,2\end{aligned}$$

### 2.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) stellt ein enzymatisches *in vitro*-Verfahren zur spezifischen Amplifikation von DNA-Fragmenten dar (193). Dazu werden zwei kurze Oligonukleotide (meist 18-25 bp) eingesetzt, die sich nach Hitzedenaturierung des DNA-Doppelstranges gerichtet an komplementäre DNA-Einzelstränge (Template) anlagern (Annealing) und somit den zu amplifizierenden Bereich flankieren. Die Verlängerung (Elongation) der Primer entlang der denaturierten DNA-Matrize findet mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase und den im Reaktionspuffer enthaltenen Desoxyribonukleotidtriphosphaten (dNTPs) statt. Um eine erneute Primeranlagerung nach der Elongation zu ermöglichen, wird die DNA zu Beginn jedes Zyklus neu denaturiert. Auf diese Weise kommt es zur exponentiellen Amplifikation der DNA.



Zur Klonierung wurde eine PCR mit Expand- oder TaKaRa-*Taq*-Polymerase und dem dazugehörigen Puffersystem durchgeführt. Beide Polymerasen zeichnen sich durch eine 3'-5'-Korrekturlesefunktion aus, die eine geringe Fehlerwahrscheinlichkeit verspricht. Als Matrize wurde chromosomale DNA oder Plasmid-DNA (1:100) eingesetzt. Je nach Anwendung wurden die PCR-Ansätze in einem Gesamtvolumen von 25, 50 oder 100 µl durchgeführt. Pro 100 µl Ansatz wurden 1 µl Template-DNA, je 100 pmol Oligonukleotide, je 20 nmol dATP/dGTP/dTTP/dCTP sowie 2 U *Taq*-Polymerase verwendet. MgCl<sub>2</sub> wurde je nach Anwendung in einer Endkonzentration von 1,5 mM oder 2 mM eingesetzt. Die Temperatur-Zeit-Zyklen, die zur PCR-Amplifikation verschiedener Matrizen-DNAs eingesetzt wurden, sind in Tab. 12 dargestellt. Abhängig von der Länge des zu amplifizierenden Gen-Abschnittes wurde die Dauer der Elongation angepasst. Der Erfolg der PCR wurde mittels TAE-Agarosegelelektrophorese überprüft.

**Tab. 12: Temperatur-Zeit-Zyklen**

Schritt	Temperatur	Zeit	Wiederholungen
Primäre Denaturierung	95°C	5 min	1 x
Denaturierung	95°C	40 sec	30 x
Annealing	48°C – 58°C	35 sec	
Elongation	68°C	60 sec/1000 bp	
Finale Elongation	68°C	7 min	1 x

### 2.3.3 Präparation von Plasmiden aus *E. coli*

#### Isolierung von Plasmid-DNA nach Holmes und Quigley (119)

Zur kostengünstigen Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde eine Einzelkolonie auf einer antibiotikahaltigen LB-Platte ausgestrichen und über Nacht inkubiert. Eine Impföse Kulturmaterial wurde in 300 µl STET-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 10 µl Lysozym-Lösung wurde der Ansatz 10 min auf Eis inkubiert und anschließend zur Zelllyse 1 min bei 99°C erhitzt. Durch Zentrifugation (12000 x g, 15 min) wurden Zelltrümmer und chromosomale DNA sedimentiert und mit einem sterilen Zahnstocher entfernt.

Zur Fällung der Plasmid-DNA wurde der wässrige Überstand mit 200 µl Isopropanol versetzt und 10 min bei -20°C inkubiert. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 12000 x g wurde der Niederschlag mit 70 % Ethanol gewaschen. Die Plasmid-DNA wurde in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und in 50 µl sterilem H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> aufgenommen

STET-Puffer	8 % (w/v) Saccharose, 5 % (v/v) Triton X-100, 50 mM EDTA, 50 mM Tris/HCl pH 8,0
Lysozym-Lösung	10 mg/ml in STET-Puffer

### **Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA mit Qiagen-Säulen**

Die zur Transfektion von AGS-Zellen bzw. zur Sequenzierung eingesetzte Plasmid-DNA, wurde säulenchromatographisch mit dem „QIAprep Spin Miniprep Kit“ von Qiagen (Hilden, D) aufgereinigt. Die Durchführung erfolgte nach Gebrauchsanleitung.

#### **2.3.4 Präparation von Plasmiden aus *H. pylori***

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *H. pylori* erfolgte mit dem Kit „Wizard™ Plus SV Miniprep“ von Promega (Madison, USA) nach Angaben des Herstellers.

#### **2.3.5 Isolierung chromosomaler DNA aus *H. pylori***

Zur Isolierung von chromosomaler DNA aus *H. pylori* wurde der „QIAamp Tissue Kit“ von Qiagen (Hilden, D) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

#### **2.3.6 Analytische und präparative Gelelektrophorese von DNA**

Für die analytische und präparative Auftrennung von DNA wurde eine horizontale Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Das zugrunde liegende Prinzip ist die Wanderung der negativ geladenen Nukleinsäuren in einem elektrischen Feld zur Anode, wobei die Auftrennung der Fragmente in der Gelmatrix nach ihrer Größe erfolgt.

Durch die Agarosekonzentration und die Laufzeit kann die optimale Trennung bestimmter Fragmentgrößen beeinflusst werden. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit  $\frac{1}{4}$  Volumen GEBS-Puffer versetzt. Die Auftrennung der Nukleinsäuren erfolgte bei einer Stromstärke von 80 V in TAE-Puffer.

Für analytische Zwecke wurden die Gele nach Beendigung des Laufs in einem Ethidiumbromidbad (1 mg/l) angefärbt. Die Dokumentation erfolgte unter UV-Durchstrahlung bei 260 nm mit Hilfe eines Videosystems (Molecular Imager Gel Doc XR System, Bio-Rad).

Für präparative Zwecke wurden Agarosegele mit einer längeren Laufstrecke verwendet und nach erfolgter Auftrennung mit einer 0,1 %-igen Methylenblau-Lösung angefärbt. Nach Entfärben des Gels mit Wasser konnten die sichtbaren DNA-Banden auf einem Durchlichttisch ausgeschnitten werden und die DNA-Fragmente wurden mit Hilfe des „E.Z.N.A.<sup>®</sup> Gel Extraction Kit“ von Peqlab (*peqlab* Biotechnologie GmbH, Erlangen, D) isoliert. Die Durchführung erfolgte hierbei nach Angaben des Herstellers.

50x TAE-Puffer	242 g/l Tris-Base, 57,1 ml/l Eisessig, 50 mM EDTA
Methylenblaulösung	1 g/l Methylenblau
GEBS-Puffer	20% (v/v) Glycerin, 50 mM EDTA, 0,05 % (w/v) Bromphenolblau, 0,5 % (w/v) N-Laurylsarcosyl

### 2.3.7 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Analytische Plasmid-DNA-Restriktionen erfolgten in einem Gesamtvolumen von 10  $\mu$ l mit Restriktionsenzymen von Roche Applied Science und den entsprechenden Puffersystemen. Es wurden etwa 2-5 U der entsprechenden Enzyme zur Hydrolyse von ca. 1  $\mu$ g DNA bei 37°C für 1,5 h eingesetzt. Der Erfolg der Spaltung wurde durch Auftragen eines Aliquots in der Agarosegelelektrophorese analysiert.

Präparative Restriktionen wurden in Volumina von 50-60  $\mu$ l durchgeführt. Dabei wurde entsprechend mehr Enzym (15 U) eingesetzt sowie die Inkubationszeit auf 4 h verlängert, um eine möglichst vollständige Restriktion der DNA zu erreichen. Die Inaktivierung der Enzyme erfolgte durch Zugabe von GEBS ( $\frac{1}{4}$  des Ansatzvolumens). Die Restriktionen wurden über präparative Agarosegele (siehe 2.3.6) aufgereinigt.

### **2.3.8 Ligation von DNA-Fragmenten**

Für Ligationen wurden in 10 µl Gesamtvolumen 1 µl 10 x Ligationspuffer und 1 U T4-DNA-Ligase (Roche Applied Science) sowie das zu inserierende DNA-Fragment und der geschnittene Vektor im Verhältnis 3:1 eingesetzt. Die Inkubation erfolgte entweder 4 h bei 16°C oder über Nacht bei 4°C. Für die nachfolgende Transformation in *E. coli* wurden 2-5 µl des Ligationsansatzes verwendet.

### **2.3.9 Fällung von DNA mit Ethanol**

Die Aufkonzentrierung und Entsalzung DNA-haltiger Lösungen erfolgte mittels Ethanolfällung. Dazu wurde die DNA-Lösung mit 1/10 Volumen einer 3 M Natriumacetat-Lösung und dem 2,5-fachen Volumen Ethanol versetzt und 30 min bei -70°C gefällt. Anschließend wurde die DNA durch Zentrifugation (10 min, 12000 x g) sedimentiert, mit 70 %-igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in dem gewünschten Volumen H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> aufgenommen.

### **2.3.10 DNA-Sequenzierung**

DNA-Sequenzierungen wurden von den Firmen MWG-Biotech (Ebersberg, D) oder Agowa (Berlin, D) durchgeführt. Die eingesetzten Sequenzierprimer waren entweder Standardprimer (bei käuflichen Plasmiden) oder selbst gewählte Oligonukleotide, die zur Sequenzierung des gewünschten DNA-Abschnittes eingesetzt wurden.

## **2.4 Allgemeine Arbeiten mit Proteinen**

### **2.4.1 Bestimmung von Proteinkonzentrationen nach Bradford (36)**

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration einer Probe wurden 100 µl einer Proteinlösung, ggf. in PBS verdünnt, mit 1 ml Bradford-Reagenz versetzt und 10 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Messung der Extinktion erfolgte bei 595 nm gegen einen entsprechenden Blindwert. Für jede Proteinbestimmung wurde eine Eichkurve mit bekannten BSA-Konzentrationen aufgenommen.

Um die Proteinkonzentration kleiner Volumina (1 µl) zu bestimmen, wurde der Assay auf das Format einer 96well-Platte skaliert und die Extinktion in einem ELISA-Reader GENios (Tecon) gemessen.

Bradford-Reagenz	0,01 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250, 5 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Phosphorsäure (85 %-ig)
------------------	--

#### **2.4.2 Herstellung bakterieller Zelllysate**

Zur Herstellung von Lysaten wurden Bakterien in PBS suspendiert und auf eine OD<sub>550</sub> von 10 eingestellt. Die Suspension wurde abzentrifugiert (4000 x g, 5 min), das Bakterienpellet in entsprechendem Volumen PBS aufgenommen und mit 2x SDS-Probenpuffer versetzt. Die Zelllysate wurden vor dem Auftragen auf ein PAA-Gel für 10 min bei 96°C gekocht.

#### **2.4.3 Fällung von Proteinen**

Die Präzipitation von Proteinen in Proteinlösungen erfolgte mittels Trichloressigsäure (TCA)-Fällung. Dazu wurde TCA-Lösung und Protein-Lösung im Verhältnis 1:4 (v/v) vermischt und 10 min lang auf Eis inkubiert. Gefällte Proteine wurden durch Zentrifugation bei 12000 x g, 5 min sedimentiert und zweimal mit 200 µl kaltem Aceton gewaschen. Abschließend wurde das Proteinpellet bei 95°C für 5 min getrocknet, um Acetonreste zu entfernen. Um die gefällten Proteinproben mittels SDS-PAGE zu analysieren, wurden die Proteine in 5x SDS-Probenpuffer aufgenommen. Im Falle eines gelben Farbumschlages wurden so lange 10 µl Aliquots 1 M Tris-Base (pH 8,5) zugegeben, bis eine Neutralisierung erfolgte. Das Probenmaterial wurde vor dem Auftragen 10 min bei 96°C gekocht.

#### 2.4.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen wurde mit dem vertikalen Gelelektrophoresesystem Mini-Protein III™ von BioRad durchgeführt, Trenn- und Sammelgele nach Sambrook *et al.* (195) angesetzt. Je nach Molekulargewicht der aufgetrennten Proteine wurden 6 % - 15 %-ige Trenngele eingesetzt, während die Konzentration des Sammelgels stets 5 % betrug. Das aufgetragene Probenvolumen betrug 2-15 µl. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteinproben erfolgte bei einer Spannung von 100-130 V, bei anfänglich niedrigeren Voltzahlen. Die aufgetrennten Proteine wurden anschließend auf eine PVDF-Membran übertragen (siehe 2.4.6) oder mit Coomassie oder Silberfärbung (siehe 2.4.5) angefärbt.

Elektrophoresepuffer	250 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS, 25 mM Tris/HCl pH 8,3
Trenngelpuffer	1,5 M Tris/HCl pH 8,8
Sammelgelpuffer	1,0 M Tris/HCl pH 6,8

#### 2.4.5 Färben aufgetrennter Proteine

Nach elektrophoretischer Auftrennung können Proteine in Polyacrylamidgelen durch Anfärbung sichtbar gemacht werden. Die Detektion von Proteinen in Polyacrylamidgelen erfolgte mittels Coomassie-Färbung nach Marshall (150) bzw. mittels Silberfärbung nach Blum *et al.* (31). Die Silberfärbung ist die empfindlichste unspezifische Färbemethode (Nachweisgrenze 5 ng Protein/Bande), allerdings mit dem Nachteil, dass sie nicht zur Quantifizierung eingesetzt werden kann, da verschiedene Proteine mit unterschiedlicher Intensität färben (182).

##### 2.4.5.1 Coomassie-Färbung (150)

SDS-Gele wurden 20 min in Coomassie-Lösung angefärbt und anschließend so lange in Entfärbelösung geschüttelt, bis die Proteinbanden deutlich sichtbar waren.

Coomassie-Färbelösung	0,275 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R 250 in 50 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure
Coomassie-Entfärbelösung	10 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Ethanol, 7,5 % (v/v) Essigsäure

### 2.4.5.2 Silberfärbung, modifiziert nach Blum *et al.* (31)

Zunächst wurden die Proteine mit einer Fixierlösung 1 h oder über Nacht bei 4°C im Gel fixiert. Durch diese Behandlung erfolgt eine Denaturierung der Proteine im Gel, diese fallen aus und ein weiteres Wandern wird verhindert. Im Anschluss erfolgten 3 Waschstschritte mit 30 %-igem Ethanol für jeweils 20 min. Danach wurde das Gel 1 min mit Thiosulfatlösung inkubiert und nach mehrmaligem Waschen (3 x 20 sec) mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> 20 min in einer Silbernitratlösung inkubiert, wobei sich Ag<sup>+</sup>-Ionen an Proteine anlagern. Überschüssige Ionen wurden 2 x 20 sec mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> abgewaschen.

Abschließend folgte der Entwicklungsschritt: Durch Zugabe von alkalischem Formaldehyd wurden die Ag<sup>+</sup>-Ionen zu elementarem Ag reduziert, was in einer Schwarzfärbung der vorhandenen Proteine resultiert. Die Reaktion wurde visuell beobachtet und mit Hilfe der Stopplösung innerhalb von 5 min beendet. Die gefärbten Gele wurden in H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> gelagert.

Alle Arbeitsschritte wurden in Glasschalen unter einem Abzug durchgeführt. Gefärbte Gele wurden zur Dokumentation mit einem Flachbettscanner digitalisiert.

Fixierlösung	10 % (v/v) Eisessig, 40 % (v/v) Ethanol
Thiosulfatlösung	0,02 % (w/v) Natriumthiosulfat
Silbernitratlösung	0,2 % (w/v) Silbernitrat 0,02 % (v/v) Formaldehydlösung (37 %-ig)
Entwicklerlösung	3 % (w/v) Natriumcarbonat 0,05 % (v/v) Formaldehydlösung (37 %-ig) 0,0004 % (w/v) Natriumthiosulfat
Stopplösung	0,5 % Glycin in H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>

## 2.4.6 Western Blot

### 2.4.6.1 Transfer von Proteinen auf PVDF-Membran

Die gelelektrophoretisch über SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mittels *semi-dry* Blotsystem durch ein senkrecht zum Gel angelegtes elektrisches Feld eluiert und auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran transferiert. Auf der Graphitanode wurde ein Stapel aus zwei dicken und zwei dünnen Filterpapieren, einer PVDF-Membran, dem PAA-Gel und wiederum zwei dünnen und zwei dicken Filterpapieren geschichtet. Vor dem Zusammenbau der Blot-Apparatur wurde die PVDF-Membran in Methanol quellen gelassen. Alle Filterpapiere und die Membran wurden mit Westerntransferpuffer getränkt. Der Proteintransfer erfolgte im Allgemeinen bei  $1 \text{ mA cm}^{-2}$  für 90 min. Kleine Proteine (10-40 kDa) wurden meist bei  $2 \text{ mA cm}^{-2}$  für 40 min geblottet.

Westerntransferpuffer	192 mM Glycin, 25 mM Tris, 20 % (v/v) Methanol, 0,1 % (w/v) SDS (pH=8,3)
-----------------------	--

### 2.4.6.2 Immundetektion immobilisierter Proteine

Nach dem Transfer der Proteine auf PVDF-Membran wurden freie Bindungsstellen auf der Membran für mindestens eine Stunde abgesättigt. Als Puffer wurde entweder TBS/3 % BSA oder TBST/5 % MMP eingesetzt. Anschließend wurde das jeweilige Antiserum je nach Titer 1:1000 bis 1:5000 in TBS/3 % BSA oder TBST/5 % BSA verdünnt und mindestens zwei Stunden inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für 10 min in TBST wurde die Membran mit einem Konjugat aus Protein A und alkalischer Phosphatase (Protein A-AP) (in TBS/1 % BSA) oder einem Peroxidase (POX)-gekoppelten Zweitantikörper (in TBST/5 % MMP) inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit TBST wurde die Membran bei Verwendung von Protein A-AP durch Schwenken in 10 ml Detektionslösung entwickelt und die Farbreaktion anschließend mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$  abgestoppt. Zum sensitiveren Nachweis über Chemilumineszenz wurden POX-gekoppelte Zweitantikörper eingesetzt, dabei erfolgte die Entwicklung mit ECL™ Western Blot Detektionsreagenzien (General Electrics/Amersham).



---

TBS	150 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl pH 7,5
TBST	TBS, 0,1 % (v/v) Tween
Detektionslösung	0,1 M Tris/HCl pH 9,6, 0,1 g/l NBT, 7 mM MgCl <sub>2</sub> , 50 mg/l BCIP

#### 2.4.6.3 Entfernung von Immunkomplexen von PVDF-Membranen

POX-entwickelte Western Blot-Membranen konnten nach Entfernung der gebundenen Antikörper erneut zur Immundetektion eingesetzt werden. Die Western Blot-Membranen wurden dazu zunächst 5 min bei Raumtemperatur (RT) mit H<sub>2</sub>O gewaschen, um Reste der Detektionslösung zu entfernen. Zum Aufbrechen der Antigen-Antikörper-Komplexe erfolgte eine 30-40 minütige Inkubation in 50 mM NaOH bei RT. Dadurch wurden die Antikörper von den immobilisierten Proteinen auf der Membran gelöst. Anschließend wurden die PVDF-Membranen 5 min in H<sub>2</sub>O gewaschen, vollständig mit Methanol benetzt und bei RT getrocknet. Die so behandelten Membranen konnten trocken über mehrere Monate gelagert werden. Durch erneutes Benetzen mit Methanol war eine Wiederholung der Immundetektion möglich.

#### 2.4.7 *In vitro*-Phosphorylierung von Tyr- und Ser-Resten

Um die Phosphorylierbarkeit von verschiedenen CagA-Varianten an den EPIYA-Motiven sowie eine Zugängigkeit des GSK-Tags für zelluläre Kinasen zu überprüfen, wurden *in vitro*-Phosphorylierungsassays mit Zelllysaten durchgeführt. Den Reaktionspuffern wurden zur Inhibition von Tyrosinphosphatasen Natriumvanadat bzw. von Serinphosphatasen ein Serin/Threoninphosphatasen spezifischer Inhibitorcocktail (PIC 1, Sigma-Aldrich) zugegeben.

Dazu wurden AGS-Zellen dreier konfluent gewachsener 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen (ca. 3 x 10<sup>7</sup> Zellen) vom Flaschenboden abgekratzt und nach Zentrifugation (5 min, 400 g) in 500 µl NP40-Puffer resuspendiert und auf Eis lysiert.

*H. pylori*-Zellen wurden mit Wattestäbchen von Platte abgenommen, in Brucella-Medium suspendiert und eine Zellzahl entsprechend einer OD<sub>550</sub> von 10 in 45 µl NP40-Puffer eingestellt. Auch hier erfolgte die Lyse auf Eis.

Anschließend wurden je 45 µl Bakterienlysate, 45 µl AGS-Zelllysate sowie 10 µl Phosphorylierungspuffer gemischt und 10 min bei 30°C inkubiert. Ein Abstoppen der Reaktion erfolgte mit 20 µl 5 x SDS-Probenpuffer.

NP40-Puffer	20 mM Tris/HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 % (v/v) Nonidet P-40, 1 mM Natriumvanadat bzw. PIC 1 (Sigma-Aldrich) 1:100
Phosphorylierungspuffer	25 mM Tris/HCl pH 7,2, 40 µM ATP, 6,25 mM MnCl <sub>2</sub> , 31,25 mM MgCl <sub>2</sub> , 62,5 µM Natriumvanadat bzw. PIC 1 (Sigma-Aldrich) 1:100

### 2.4.8 Immunpräzipitation

Um Protein-Protein Interaktionen spezifisch nachzuweisen, wurde die Methode der Immunpräzipitation eingesetzt. Dazu wurde ein Antikörper gegen das gewünschte Protein einem Proteingemisch zugegeben und anschließend dieses Protein samt Interaktionspartner abgetrennt. Dies erfolgte mit Hilfe von an Agarosekügelchen gekoppeltem Protein G, welches mit hoher Spezifität an die Fc-Region der meisten Säugetier-Immunglobuline bindet.

Verschiedene *H. pylori*-Stämme wurden auf Agarplatten angezogen, in PBS resuspendiert und 2 x in PBS gewaschen. Anschließend wurden ca.  $5 \times 10^{10}$  Bakterien in RIPA-Puffer resuspendiert und die Zellen auf Eis durch Ultraschall aufgebrochen. Die Abtrennung ganzer Zellen erfolgte durch Zentrifugation (10000 x g, 10 min, 4°C). Dem Überstand wurden 5 µl des entsprechenden Antikörpers ( $\alpha$ CagA, AK257) zugegeben und 3-4 h bei 4°C auf einem Rollrad inkubiert. Zur Präzipitation der CagA-AK-Komplexe wurden 50 µl, entsprechend den Angaben des Herstellers vorbehandelte, Protein G-Agarose (Roche Diagnostics) zugegeben und für zusätzliche 2 h inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit RIPA-Puffer wurden die Proteine mit 100 mM Glycin, pH 2,7 eluiert bzw. direkt in SDS-Probenpuffer aufgenommen und gekocht.

RIPA-Puffer	50 mM Tris/HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 % (v/v) Nonidet P-40, 0,25 % (w/v) Natriumdeoxyolat, Proteaseinhibitoren; 1 mM PMSF, 10 µg/ml Leupeptin, 10 µg/ml Pepstatin
-------------	--

### 2.4.9 GST-pulldown Assay

Ein weiterer Ansatz, um spezifisch interagierende Proteine zu identifizieren, oder um bekannte Interaktionen genauer zu charakterisieren ist die Methode des GST-pulldown Assays. Dabei wird ein Protein heterolog als Glutathion S-Transferase (GST)-Fusion in *E. coli* exprimiert und über Affinitätschromatographie an Glutathion-Sepharose gekoppelt.

Heterologe Expression, Induktion, Zellaufschluss sowie Affinitätschromatographie erfolgten wie unter 2.5 beschrieben. Die so gewonnenen Fusionsproteine, gekoppelt an Sepharosekügelchen wurden bei 4°C gelagert und nach einmaligem Waschen für den Assay verwendet. Als Ausgangsmaterial wurden bei *H. pylori* zwei Platten, im Falle von *E. coli* eine Platte Bakterienmaterial eingesetzt. Dazu wurden die Zellen in 1 ml PBS suspendiert und pro Ansatz eine optische Dichte von 10 in 400 µl eingestellt. Das Koloniematerial wurde bei 4000 rpm 5 min abzentrifugiert und in 400 µl Pulldownpuffer aufgenommen. Die Zellen wurden ca. 10 min auf Eis inkubiert und zum vollständigen Zellaufschluss mit Ultraschall behandelt. Nicht aufgeschlossene Zellen und Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (12000 x g, 10 min, 4°C) abgetrennt. Der resultierende Überstand wurde als Ausgangsmaterial für das pulldown-Experiment eingesetzt.

Nach Zugabe von 10 µl Sepharosekügelchen, gekoppelt an GST-Fusionsproteine, wurden die Ansätze 2 h bei 4°C auf einem Rollrad inkubiert. Anschließend wurde die Matrix 3 x mit 1 ml Pulldownpuffer (500 x g, 5 min) gewaschen, in 25 µl 2 x SDS-Probenpuffer aufgenommen und 2 min bei 96°C gekocht. Um eine unspezifische Bindung des interagierenden Proteins mit GST oder der Sepharosematrix ausschließen zu können, wurden alle Interaktionen mit GST, gekoppelt an Glutathion-Sepharose als Negativkontrolle überprüft. Um die Proteinmenge im Ausgangsmaterial abschätzen zu können, wurden alle Startextrakte ebenfalls getestet.

Pulldownpuffer	PBS, 1 mM EDTA, 0,5 % (v/v) Nonidet-P40, Proteaseinhibitoren 1 mM PMSF, 1 µM Leupeptin, 1 µM Pepstatin
----------------	--

## 2.5 Heterologe Expression, Reinigung und Charakterisierung von Fusionsproteinen

### 2.5.1 Expression von GST-Fusionsproteinen und Zellaufschluss

Zur heterologen Expression von Proteinen wurde das Glutathion S-Transferase System verwendet, bei dem die Proteine als N-terminales GST-Fusionsprotein in *E. coli* überproduziert und mittels Affinitätschromatographie an Glutathion-Sepharose gereinigt werden. Die zu exprimierenden Gene wurden im korrekten Leserahmen an das 3'-Ende des *gst*-Gens im Vektor pGEX4T-3 fusioniert und in den *E. coli*-Stamm BL21(DE3) transformiert. Transformierte Einzelklone wurden zunächst in einer Testinduktion im kleinen Maßstab (3 ml) auf Expression des gewünschten Proteins überprüft.

Dazu wurde eine Einzelkolonie in LB-Medium, supplementiert mit entsprechenden Antibiotika, bis zu einer OD<sub>550</sub> zwischen 0,6 und 0,8 wachsen gelassen, die Expression mit 200 µM IPTG induziert und weitere 2 h bei 37°C und 200 rpm in einem Schüttelinkubator bebrütet. Geeignete Transformanten wurden dann in größerem Maßstab angezogen. Die optimalen Wachstums- und Expressionsbedingungen wurden in Optimierungsexperimenten ermittelt. Zur Aufreinigung von Fusionsproteinen wurde eine 25 ml Übernachtskultur zur Inokulation von 250 ml LB-Medium verwendet. Dies entsprach einer optischen Dichte bei 550 nm von etwa 0,1.

Die Kultur wurde bei 37°C bis zu einer OD<sub>550</sub> = 0,3 bebrütet und anschließend bei 27°C inkubiert, um einen Abbau der zu exprimierenden Proteine zu verringern. Bei einer OD<sub>550</sub> zwischen 0,6 und 0,8 wurden die Kulturen mit 200 µM induziert und weitere 3-4 h bei 27°C geschüttelt. Die Zellernte erfolgte bei 2300 g, 20 min und 4°C. Das Bakterienpellet wurde in 4 ml Lysepuffer aufgenommen, 15 min auf Eis inkubiert und anschließend die Zellen mittels Ultraschallbehandlung aufgebrochen. Durch Zentrifugation 20 min bei 4000 rpm wurden nicht aufgeschlossene Zellen sowie Zelltrümmer abgetrennt. Der erhaltene Überstand wurde zur Affinitätschromatographie eingesetzt.

Lysepuffer	50 mM Tris/HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,5 % (v/v) Nonidet P-40, Proteaseinhibitoren 1 mM PMSF, 1 µM Leupeptin, 1 µM Pepstatin
------------	---

### 2.5.2 Affinitätschromatographie

Zur affinitätschromatographischen Reinigung von GST-Fusionsproteinen wurde als Matrix Glutathion-Sepharose eingesetzt. Glutathion bindet spezifisch die Glutathion S-Transferase (GST). Durch Verwendung von reduziertem Glutathion können gebundene Proteine kompetitiv von der Matrix verdrängt und somit eluiert werden.

Die verwendete Matrix wurde entsprechend den Angaben des Herstellers equilibriert. 250 µl aufgeschlämmte Glutathion-Sepharose wurden mit dem Überstand der aufgeschlossenen Zellen (siehe 2.5.1) vermischt und 1 h auf einem Rollmischer inkubiert. Durch dreimaliges Waschen (500 x g, 5 min) mit Lysepuffer wurden unspezifisch assoziierte Proteine von der Matrix entfernt. Der letzte Waschschrift erfolgte in PBS ohne Proteaseinhibitoren. Um Proteine wieder von der Matrix zu entfernen, wurde entweder eine Elution mit reduziertem Glutathion durchgeführt und anschließend der GST-Tag mittels Thrombinhydrolyse entfernt oder das Fusionsprotein direkt von der Säule mit der Endopeptidase Thrombin abgespalten. Zur Elution wurde die Sepharose dreimal 10 min bei RT mit 500 µl Elutionspuffer inkubiert und die Eluate nach Zentrifugation von 5 min bei 500 x g vereinigt. Zur Thrombinspaltung wurden pro Ansatz 25 µl Thrombin (10 U/µl) zugegeben und 2 h bei 4°C inkubiert. Durch Zugabe von 1 mM PMSF wurde die Thrombinaktivität inhibiert.

Elutionspuffer

10 mM reduziertes Glutathion in 50 mM Tris/HCl pH 8,0

### 2.5.3 Analytische Gelfiltration

Mittels Gelfiltration können Proteine und Proteinkomplexe nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Die analytische Gelfiltration wurde an einer SMART-Anlage (Amersham Biosciences) durchgeführt. Es wurden die Säulen Superdex® R 75 PC 3.2/30 und Superdex® 200 PC 3.2/30 (Amersham Pharmacia Biotec) eingesetzt. Die Gelfiltration erfolgte in 50 mM Tris pH 8,0 bei einem Fluss von 40 µl/min. Als Markerproteine für die Kalibrierung der Säulen wurden Thyroglobulin (669 kDa), Ferritin (440 kDa), Katalase (232 kDa), Aldolase (158 kDa), Rinderserumalbumin (67 kDa), Ovalbumin (45 kDa) und Ribonuklease A (14 kDa) eingesetzt.

Für die spätere Analyse durch SDS-Page wurden Fraktionen zu 25 µl gesammelt. Proteinproben wurden vor dem Auftragen auf die Säulen bei 45000 x g für 45 min ultrazentrifugiert. Die gesammelten Fraktionen wurden über SDS-PAGE und anschließende Immunoblots analysiert. Die Auswertung erfolgte densitometrisch mit Hilfe des Softwarepaketes Quantity One 4.4.0 (BioRad).

## **2.6 Immunfluoreszenz-Mikroskopie**

### **2.6.1 Immunfluoreszenz-Mikroskopie mit GFP-exprimierenden Bakterien**

Um eine Expression von GFP-Fusionsproteinen in *H. pylori* oder *E. coli* zu überprüfen wurden Bakterien von Platte abgenommen, in 25 µl PBS auf einem Objektträger verteilt und mit einem Deckglas bedeckt. Danach erfolgte direkt die mikroskopische Auswertung mit einem Immunfluoreszenz-Mikroskop mit Kameraaufsatz.

### **2.6.2 Doppelimmunfluoreszenzfärbung mit *H. pylori***

Um eine Lokalisation zweier Proteine in räumlicher Nähe mikroskopisch darzustellen, wurden Doppel-Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Zur Detektion intrazellulärer Proteine wurden die Zellen mit Hilfe von Lysozym und Triton X-100 permeabilisiert (modifiziert nach (131) und (108)). Dazu wurden über Nacht gewachsene Bakterien in PBS suspendiert und eine  $OD_{550}=10$  in 250 µl 4 %-iger Paraformaldehyd (PFA)-Lösung zunächst 10 min bei RT und anschließend weitere 50 min auf Eis fixiert. Nach 2-3 maligem Waschen in PBS (2300 x g, 5 min) wurde das Bakterienzellpellet in 135 µl GTE resuspendiert, mit 15 µl Lysozymlösung (2 mg/ml) versetzt und 10 min auf Eis inkubiert. Währenddessen wurden runde Deckgläschen in die Vertiefungen einer 24-well Zellkulturschale gelegt und mit jeweils 500 µl PBS bedeckt. Anschließend wurden in jede Vertiefung 25 µl der fixierten, mit Lysozym behandelten, Bakterienzellen pipettiert und durch Zentrifugation sedimentiert. Danach erfolgte der Permeabilisierungsschritt mit 0,1 % Triton X-100 in PBS für 5 min bei RT. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden unspezifische Bindungsstellen mit Blockingpuffer für 20 min abgesättigt.

Primäre Antikörper wurden zur Detektion des entsprechenden Antigens i. d. R. 1:50 in PBS verdünnt und 1 h bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS wurden Alexa Fluor<sup>488</sup>- oder Alexa Fluor<sup>555</sup>-gekoppelte, gegen die entsprechende Spezies des ersten Antikörpers gerichtete, Sekundärantikörper eingesetzt. Diese wurden 1:750 oder 1:1000 in PBS verdünnt und 30-45 min bei RT inkubiert. Nach drei Waschschritten wurden die Präparate in FluoPrep<sup>TM</sup> (BioMerieux) eingebettet, getrocknet und mit Nagellack versiegelt. Die Lagerung erfolgte im Dunkeln bei 4°C. Je nach Ursprungsspezies der primären Antikörper erfolgte die Inkubation zeitgleich (bei Antikörpern unterschiedlicher Spezies) oder sequenziell (Antikörper der gleichen Spezies), wobei der zuerst eingesetzte Primärantikörper durch den Zweitantikörper detektiert wird, bevor er zweite Primärantikörper zugegeben wird. Um die Spezifität der durchgeführten Färbungen abzusichern, wurden bei allen Ansätzen eine Zweit-Antikörper-Kontrolle sowie eine Negativkontrolle mitgeführt. Die mikroskopische Auswertung erfolgte mittels eines Immunfluoreszenz-Mikroskops (Leica) bzw. bei konfokalen Aufnahmen mit einem Laserscanning-Mikroskop mit einem BioRad 1024 UV-System unter Verwendung eines Krypton-Argon-Lasers und den Filtersätzen E1/T2. Die Bilder wurden digital abgespeichert und mit den Softwarepaketen Adobe Photoshop und MetaMorph bearbeitet.

4 % PFA-Lösung	4 % (w/v) Paraformaldehyd in PBS
GTE	1,8 % (w/v) Glucose, 10 mM EDTA in 25 mM TrisHCl, pH 8
Blockingpuffer	PBS mit 1 % (w/v) BSA

### 2.6.3 Mikroskopie transfizierter AGS-Zellen

Die Zellen wurden frühestens 24 h nach der Transfektion zur Mikroskopie verwendet, um eine ausreichende Expression des transfizierten Gens zu gewährleisten. Das Medium wurde abgesaugt, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C in 4 %-iger PFA-Lösung fixiert. Anschließend wurde wiederum zweimal mit PBS gewaschen, die Präparate in FluoPrep<sup>TM</sup> (BioMerieux) auf Objektträgern getrocknet und mit Nagellack versiegelt.

Die mikroskopische Betrachtung erfolgte je nach Fragestellung mit einem Fluoreszenzmikroskop bzw. einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop.

### III Ergebnisse

#### 1 Etablierung eines Reporterassays zum Nachweis Typ IV-translozierter Proteine

Die Translokation von Effektorproteinen in eukaryotische Zielzellen erfordert zwei Schritte: (a) Die Sekretion der Effektoren über die bakteriellen Membranen, und (b) die Translokation dieser Effektormoleküle über eine eukaryotische Membran. Dieser Transport cytosolischer Substrate bedarf der Erkennung eines oder mehrerer Signale, und auch eine Interaktion mit Chaperonen und Chaperon-ähnlichen Proteinen kann für den Translokationsprozess notwendig sein. Welche Apparatskomponenten und/oder assoziierte Proteine spezifisch T4-Sekretionssignale erkennen ist noch nicht bekannt. Um Proteinsignale und Komponenten der Sekretionssysteme, die für den Effektorproteintransport in Zielzellen notwendig sind, charakterisieren zu können, wurden in der Literatur verschiedenste Reporter-Assays beschrieben. Viele Testsysteme haben sich in bestimmten Mikroorganismen als funktionell erwiesen, sind aber oft nicht ohne weiteres auf andere Spezies übertragbar.

Um die Fragestellungen der vorliegenden Arbeit zu beantworten, sollte zunächst ein geeignetes Reportersystem etabliert werden, um eine Translokation von Effektorproteinen von *H. pylori* in Wirtszellen überprüfen zu können. Der Nachweis einer CagA-Translokation sollte unabhängig von einer Tyrosin-Phosphorylierung an den EPIYA-Motiven des Proteins und damit unabhängig von einer Membranrekrutierung in cytosolischen Zellkompartimenten möglich sein.



## 1.1 TEM-1 $\beta$ -Laktamase-Assay

Ein Reporterassay, der zunächst getestet wurde, basiert auf der Fusion von Proteinen mit der  $\beta$ -Laktamase TEM-1 (47). In Infektionsexperimenten wird nach Sekretion der Fusionsproteine in eukaryotische Zielzellen das fluoreszierende  $\beta$ -Laktamase-Substrat CCF2/AM zugegeben. Dessen Spaltung durch die TEM-1  $\beta$ -Laktamase-Domäne des translozierten Hybridproteins unterbindet den CCF2/AM *fluorescence resonance energy transfer* (FRET), was zu einem veränderten Fluoreszenzsignal von grün (520 nm) nach blau (450 nm) führt. Damit ist eine mikroskopische Auswertung möglich und ein *screening*-Assay mit Hilfe von 96-well-Platten wäre denkbar.

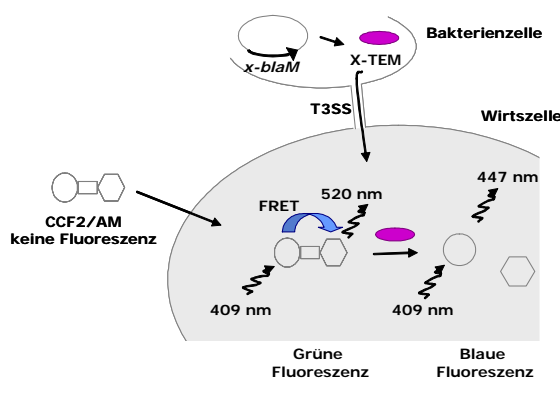
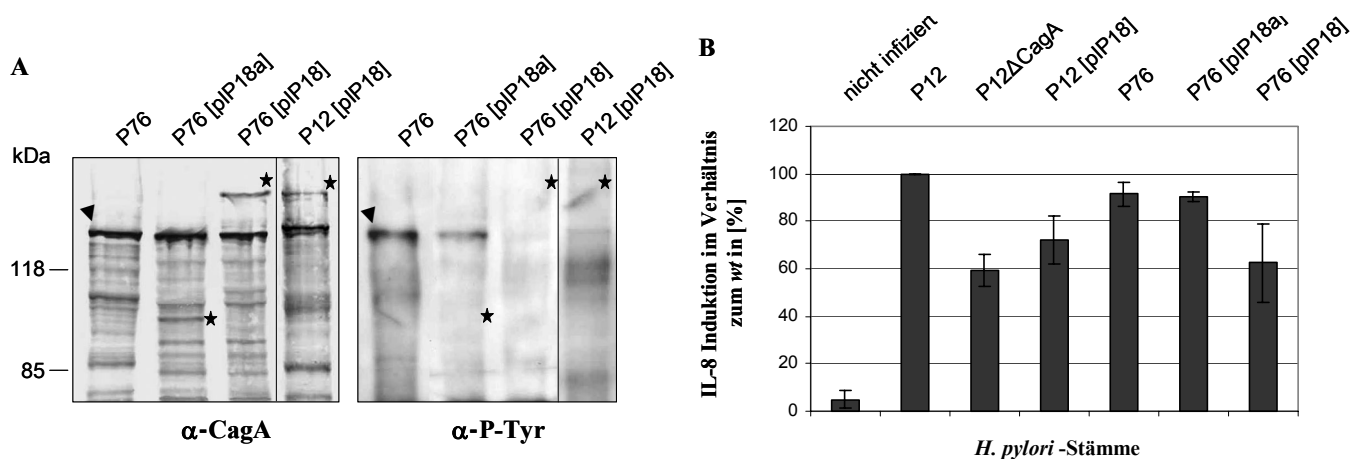


Abb. 6: Schematische Darstellung des TEM-1  $\beta$ -Laktamase-Assays (Abb. nach (47), verändert).

Zunächst wurden Fusionen des *blaM*-Gens, welches für die reife Form der  $\beta$ -Laktamase TEM-1 codiert, mit *cagA*(1-3642) (pIP18) und *cagA*(1800-3642) (pIP18a) hergestellt und in den *H. pylori wt*-Stämmen P12 und P76 exprimiert. Zur Konstruktion des Plasmides pIP18a wurde das Gen *blaM* mit Hilfe des Primerpaares WS274/WS275 vom Plasmid pCX302 amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen *NdeI/BglII* zusammen mit dem *cagA*-Fragment (bp 1800-3642) über *BamHI/KpnI* in den GSK-Expressionsvektor (siehe Abb. 9) ligiert. Alternativ wurde das gesamte *cagA*-Gen des Stammes P12 (Primer WS265/JP67) über *BamHI/KpnI* kloniert und so pIP18 generiert.

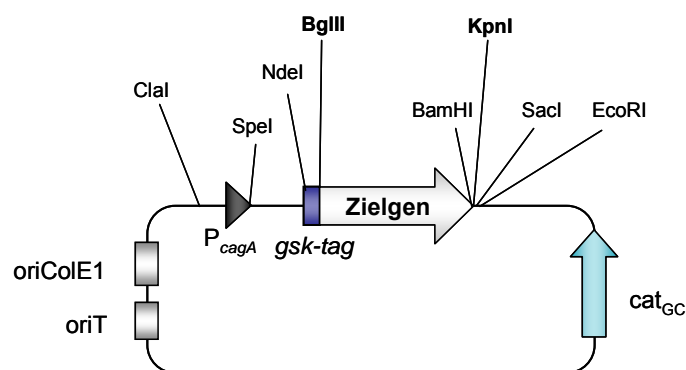
Infektionsexperimente von AGS-Zellen mit positiven Transkonjuganden zeigten, dass TEM-1-CagA im Tyrosinphosphorylierungsassay nicht transloziert wird (Abb. 7). Darüber hinaus wird die Translokation des CagA<sub>wt</sub>-Proteins durch das Fusionsprotein TEM-CagA im Stamm P76 vollständig und im Stamm P12 größtenteils unterbunden. Ein solcher dominant-negativer Effekt wird auch bei der Expression von GFP-CagA Fusionen in *wt H. pylori*-Stämmen beobachtet. Die Fusion der C-terminalen CagA-Hälfte an TEM scheint keinen großen Einfluss auf die CagA<sub>wt</sub>-Translokation zu haben, was aber auch an der schwächeren Expression liegen kann. Bei dem *H. pylori*-Stamm P76 ist, wie auch bei dem Stamm P12 und im Gegensatz zu 26695 (87), die IL-8-Induktion von einer CagA-Translokation abhängig. Nach Überprüfung dieses Parameters zeigte sich, dass die Stämme P76 [*blaM-cagA*<sup>+</sup>] und P12 [*blaM-cagA*<sup>+</sup>] kein CagA translozieren (Abb. 7). Dadurch wird der dominant-negative Effekt bestätigt.



**Abb. 7: Infektion von AGS-Zellen mit TEM-1-CagA Fusionen. (A) TEM-1-CagA-Fusionsproteine werden nicht tyrosinphosphoryliert.** AGS-Zellen wurden mit P76 [pIP18a], P76 [pIP18] sowie P12 [pIP18] infiziert. Die Lysate der Infektionsansätze wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und der Western Blot mit  $\alpha$ -CagA (AK257) bzw.  $\alpha$ -P-Tyr entwickelt. Das *wt* CagA-Protein (Pfeil) wird nur im Stamm P76 [pIP18a], nicht aber im Stamm P76 [pIP18] phosphoryliert. Eine Tyrosin-Phosphorylierung der Fusionsproteine (Stern) konnte nicht nachgewiesen werden. **(B) IL-8-Produktion von AGS-Zellen, infiziert mit verschiedenen *H. pylori*-Stämmen.** Zellkulturüberstände von Infektionsansätzen der dargestellten *H. pylori*-Stämme wurden mittels Sandwich-ELISA auf IL-8 getestet. Die IL-8-Induktion ist in Relation zum *wt* in Prozent angegeben.



Als geeignetes Expressionssystem in *H. pylori* wurde der pHel2-Shuttle-Vektor verwendet (111). In diesen, sowohl in *E. coli* als auch in *H. pylori* replizierenden Vektor, wurden der *cagA*-Promotor sowie der GSK-Tag kloniert. Bei dem  $P_{cagA}$  handelt es sich um einen starken, in *E. coli* und *H. pylori* konstitutiv aktiven Promotor, was den Vorteil hat, dass eine Expression gewünschter Fusionskonstrukte schon in *E. coli* überprüft werden kann. Bei der Konstruktion des Vektors wurde darauf geachtet, dass N-terminale *in-frame* Fusionen mit gewünschten Proteinen möglich sind. In diesem Vektor konnten nun über *Bgl*III- sowie *Kpn*I-Restriktionsschnittstellen verschiedene GSK-Fusionsproteine hergestellt und ausgetauscht werden. Abbildung 9 zeigt eine schematische Darstellung des GSK-Expressionsvektors.

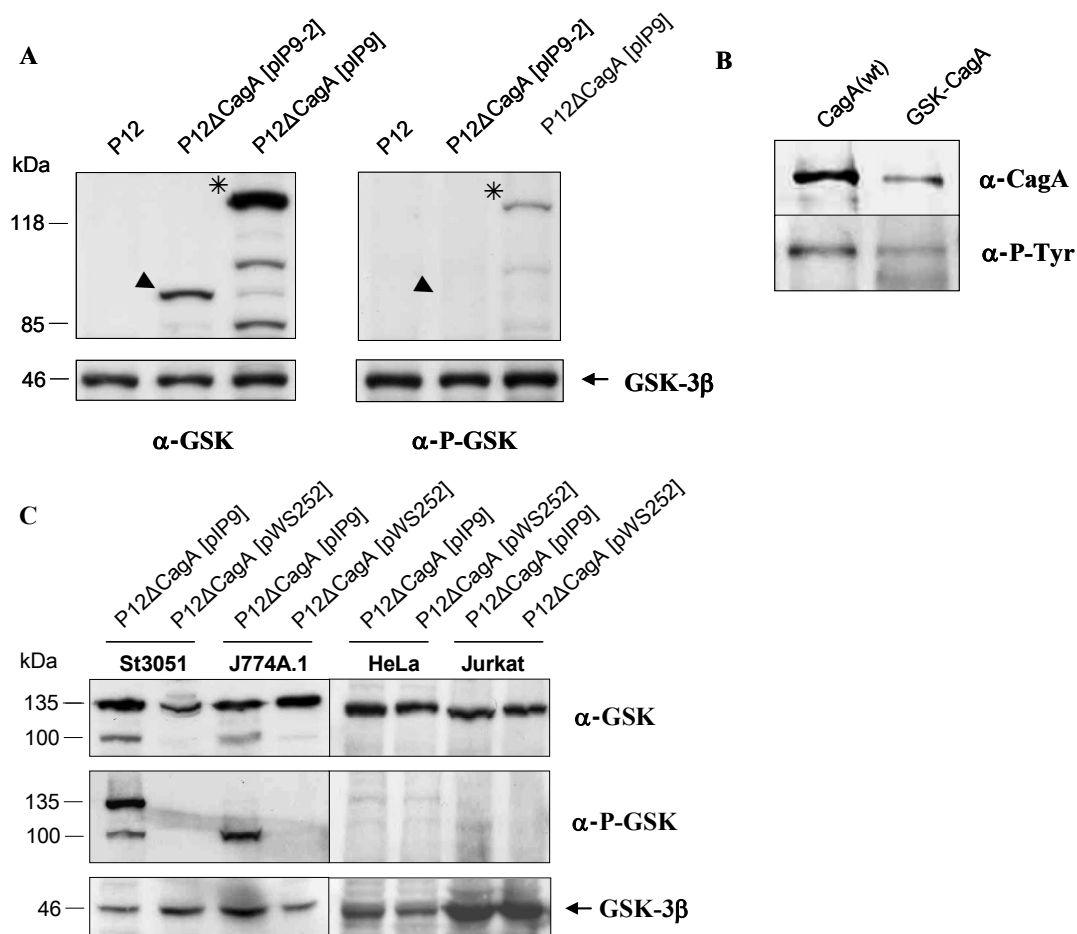


**Abb. 9: Schematische Darstellung des GSK-Expressionsvektors.**

Illustriert sind die wichtigsten Restriktionsschnittstellen. Die Selektion transformierter Bakterienzellen erfolgt über Chloramphenicol-Resistenz.

Um die Funktionalität einer GSK-Fusion im Cag-T4SS zu testen, wurde das bisher einzige bekannte Effektorprotein CagA N-terminal mit dem Tag fusioniert. Das resultierende Plasmid pIP9 wurde in *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert und auf Expression überprüft. Nach Isolierung und Sequenzierung des Vektors konnte das Konstrukt über Konjugation mit dem *E. coli*-Stamm  $\beta$ 2155 in *H. pylori* P76 eingebracht werden. Durch Reisolierung von pIP9 und Transformation wurde *gsk-cagA* im Stamm P12 $\Delta$ *cagA* exprimiert und in Infektionsassays auf Translokation und GSK-Phosphorylierung überprüft. In Abbildung 10A sind die Ergebnisse der Infektion von AGS-Zellen dargestellt. Als Negativkontrolle wurde der Stamm P12 $\Delta$ *cagA* [pIP9-2] eingesetzt, der ein nicht translozierbares GSK-CagA Derivat (GSK-CagA1–512) (vgl. Abschnitt 2.1) exprimiert, um eine Kreuzreaktion des phosphospezifischen P-GSK-3 $\beta$ -Antiserums mit dem nicht phosphorylierten GSK-Tag auszuschließen. Zusätzlich wurde gezeigt, dass GSK-CagA unverändert auch an den EPIYA-Motiven tyrosinphosphoryliert wird (Abb. 10B).

Nachdem die Funktion des GSK-Tags in AGS-Zellen für das Cag-T4SS gezeigt werden konnte, wurde dies mit weiteren Zelllinien überprüft. Zu diesem Zweck wurden die Mukus-produzierende Magenepithelzelllinie St3051, HeLa-Zellen, die Makrophagenzelllinien J774A.1 und THP-1 sowie die T-Zelllinie Jurkat infiziert. Auch hier wurde der Stamm P12 $\Delta$ cagA [pIP9] eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde eine nicht translozierbare GSK-CagA-Variante, in diesem Falle GSK-CagA $\Delta$ 20C (pWS252) verwendet (vgl. auch Abschnitt 2.1). Es konnte gezeigt werden, dass der GSK-Tag in den Zelllinien St3051, J774A.1, THP-1 sehr gut phosphoryliert wird. In Jurkat sowie HeLa-Zellen konnte keine GSK-Phosphorylierung nachgewiesen werden.



**Abb 10: Der phosphorylierbare GSK-Tag kann als Reporterassay im Cag-T4SS eingesetzt werden.** (A) Infektion von AGS-Zellen mit *H. pylori* P12 $\Delta$ cagA[pIP9] bzw. [pIP9-2]. (B) Tyrosinphosphorylierung CagA<sub>wt</sub> und GSK-CagA nach Infektion von AGS-Zellen. (C) Infektion von St3051-, J774A.1-, HeLa- und Jurkat-Zellen mit P12 $\Delta$ cagA[pIP9] bzw. [pWS252]. Die Lysate der Infektionsansätze wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und der Western Blot mit  $\alpha$ -GSK bzw.  $\alpha$ -P-GSK Antiseren entwickelt. Alle GSK-Fusionen werden exprimiert ( $\alpha$ -GSK), jedoch nur bei GSK-CagA ist eine Phosphorylierung und damit eine Translokation erkennbar. Als interne Auftragskontrolle ist die zelluläre GSK-3 $\beta$  abgebildet.

## 2 Charakterisierung des CagA-Translokationssignals

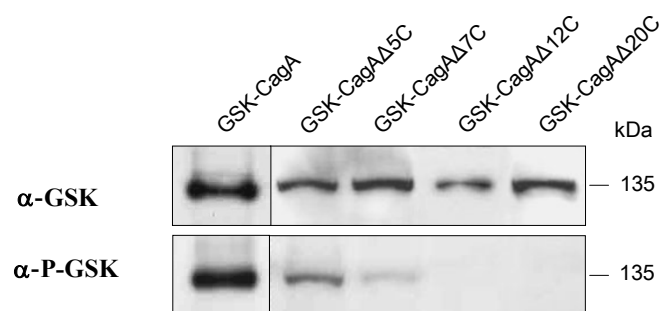
Die Charakterisierung des Sekretionssignals auf dem Effektormolekül CagA ist eine grundlegende Fragestellung, um Einblick in den molekularen Mechanismus der Substraterkennung und den Transport durch den Cag-Sekretionsapparat zu bekommen. Die Kenntnis bestimmter Motive kann auch zur Identifizierung weiterer möglicher translozierter Proteine genutzt werden. Vorangegangene Arbeiten haben gezeigt, dass bei Fusionen der N- sowie der C-terminalen Hälfte des CagA-Moleküls mit dem *green fluorescent protein*, die C-terminale, nicht aber die N-terminale, Fusion einen dominant-negativen Effekt auf die Translokation von *wt* CagA ausübt (118). Dies lässt darauf schließen, dass im C-terminalen Teil des CagA-Proteins die Information enthalten ist, welche für eine Hinführung zum und eine Einführung in den Sekretionsapparat hinreichend ist.

Durch die Etablierung des GSK-Reporterassays stand nun ein geeignetes, von einer Tyrosin-Phosphorylierung unabhängiges, Testsystem zum Nachweis der CagA-Translokation zur Verfügung. Dies sollte zur Charakterisierung des C-terminalen Translokationssignals und auch zur Eingrenzung N-terminaler, für den Transport notwendiger, Bereiche eingesetzt werden. Ein weiteres Ziel war es, die kleinste translozierbare CagA-Einheit festzulegen.

### 2.1 Analyse von CagA-Varianten mit C-terminalen Deletionen

In vorangegangenen Arbeiten wurden bereits CagA-Varianten mit C-terminalen Deletionen auf ihre Translozierbarkeit untersucht. Durch definierte Deletionen konnte gezeigt werden, dass das Fehlen von 5 Aminosäuren keinen Einfluss auf die CagA-Translokation hat, eine Deletion von 7 Aminosäuren zu einer verringerten CagA-Tyrosinphosphorylierung zu führen scheint und Deletionen von 20 oder mehr Aminosäuren diese komplett verhindern. Nicht klar war allerdings, ob es sich dabei tatsächlich um einen Verlust der Translokationsfähigkeit oder nur um eine fehlende Tyrosin-Phosphorylierung handelt.

Zur Absicherung sollte der GSK-Tag als aussagekräftigeres, von einer CagA-Lokalisation in der Zelle unabhängiges System eingesetzt werden. Dazu wurden die CagA-Varianten GSK-CagA $\Delta$ 5C, GSK-CagA $\Delta$ 7C, GSK-CagA $\Delta$ 12C und GSK-CagA $\Delta$ 20C in den GSK-Expressionsvektor kloniert und im *H. pylori*-Stamm P12 exprimiert. Infektionsexperimente mit AGS-Zellen und anschließende  $\alpha$ -GSK- und  $\alpha$ -P-GSK-Immunoblot-Analysen zeigten Ergebnisse analog zur CagA-Phosphorylierung der nicht mit einem Tag versehenen Varianten. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass bei einer Deletion von 12 Aminosäuren CagA nicht mehr transloziert wird (Abb. 11).

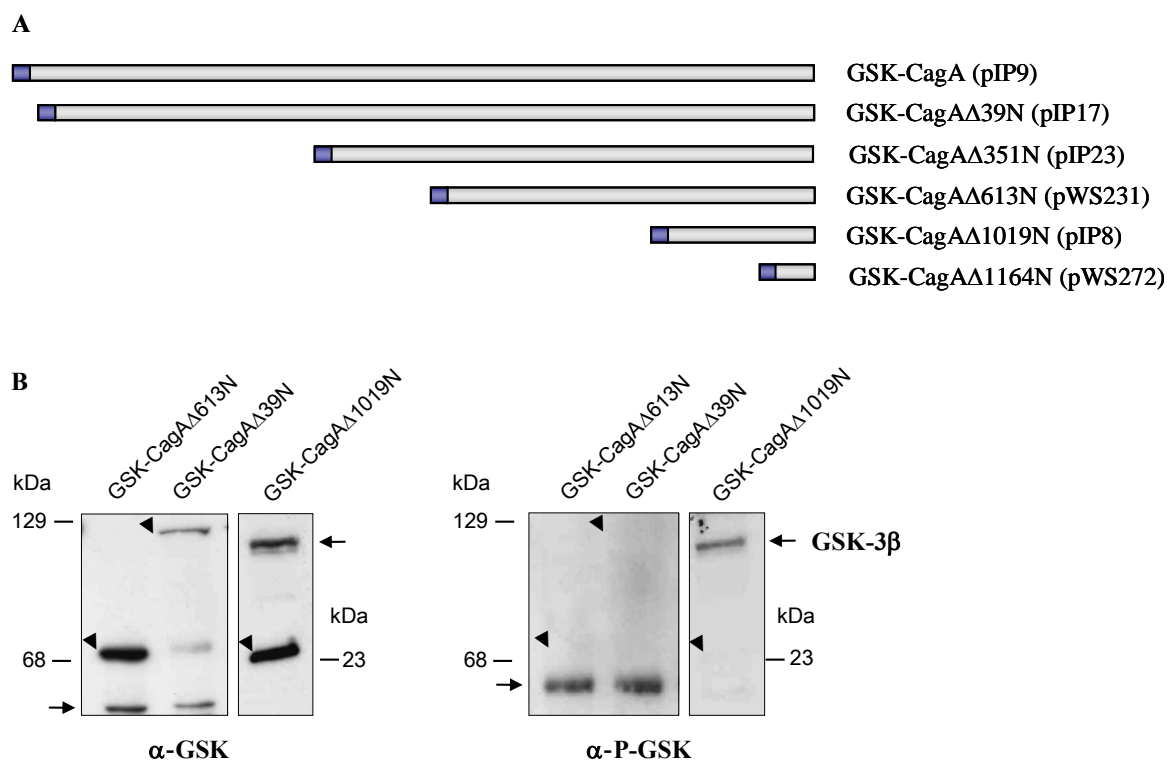


**Abb. 11: Einfluss C-terminaler Deletionen auf die CagA-Translokation.** Definierte Deletionen von 5, 7, 12 und 20 C-terminalen Aminosäuren. Das Molekül GSK-CagA $\Delta$ 5C wird noch effizient transloziert, während bei GSK-CagA $\Delta$ 7C die Translokationseffizienz weitaus geringer ist. Deletionen von 12 oder mehr Aminosäuren vom C-Terminus führen dazu, dass CagA nicht mehr als Substrat erkannt wird. Abgebildet sind mit Antiseren gegen GSK und P-GSK entwickelte Immunoblots von Infektionsansätzen, die über SDS-PAGE aufgetrennt wurden.

## 2.2 Analyse von CagA-Varianten mit N-terminalen Deletionen

Mit der Zielsetzung, das kürzeste translozierbare CagA-Fragment einzugrenzen, wurden eine Reihe von N-terminalen Deletionen generiert. In Abb. 12 sind die getesteten CagA-Varianten schematisch dargestellt. Die Konstrukte wurden generell schwächer exprimiert als Volllängen-CagA und andere Varianten, jedoch in ausreichenden Mengen, um Infektionsexperimente durchzuführen. Überraschenderweise konnte bei keinem dieser Konstrukte eine GSK- oder Tyrosinphosphorylierung, und damit eine Translokation nachgewiesen werden.

Zusätzlich wurde versucht ein sehr kurzes (50 AA) C-terminales CagA-Fragment an den GSK-Tag zu fusionieren. Dieses Konstrukt konnte jedoch nicht in ausreichenden Mengen exprimiert werden.



**Abb. 12: CagA-Varianten mit N-terminalen Deletionen.** (A) Schematische Darstellung (B) In Infektionsexperimenten konnte bei keinem dieser Konstrukte (Pfeilspitzen) eine Translokation in AGS-Zellen festgestellt werden. Abgebildet sind mit  $\alpha$ -GSK und  $\alpha$ -P-GSK Antikörpern entwickelte Immunoblots von über SDS-PAGE aufgetrennten Lysaten. Zelluläre GSK-3 $\beta$  ist mit Pfeilen markiert.

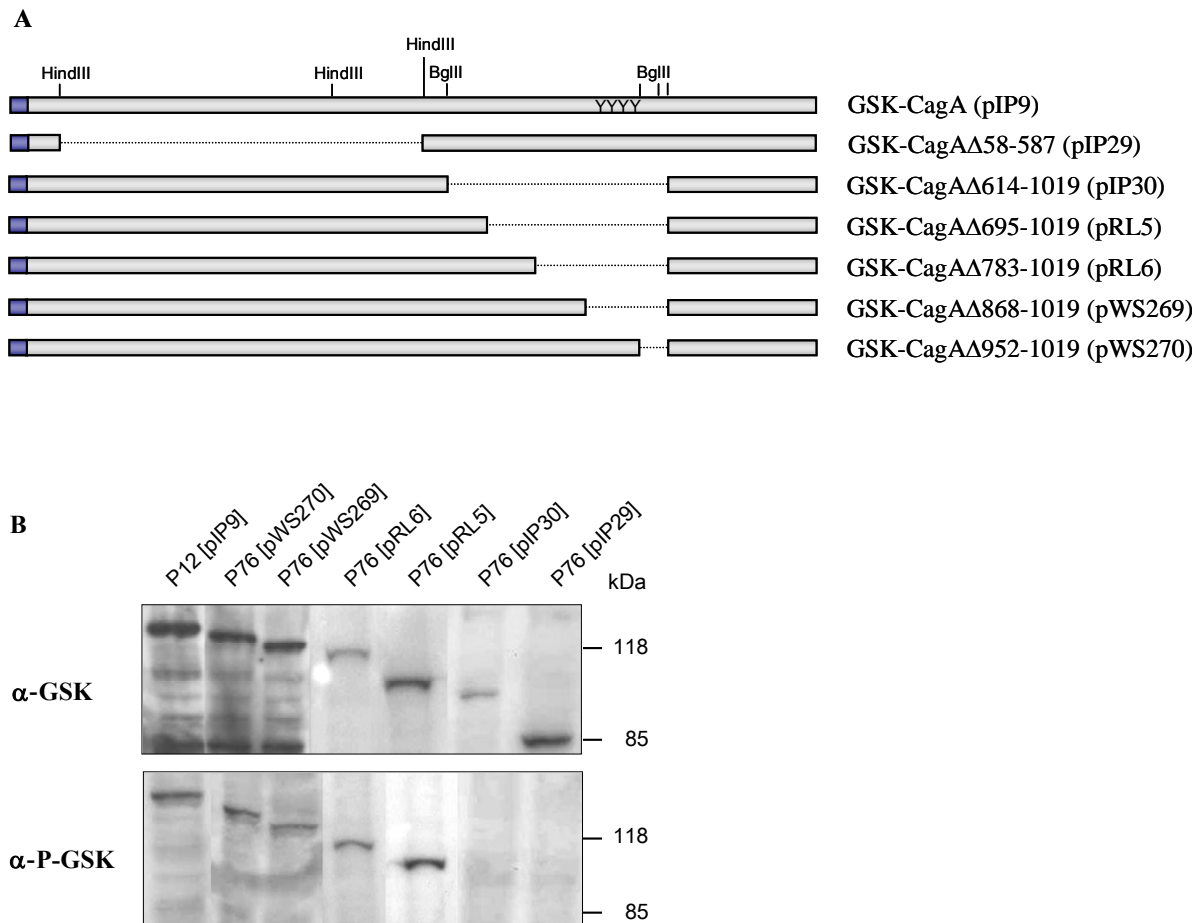


### 2.3 Analyse von CagA-Varianten mit internen Deletionen

Um nachzuweisen, ob die Translokationsfähigkeit von einer kurzen N-terminalen Region abhängig ist, wurde eine GSK-getaggte CagA-Variante mit interner Deletion hergestellt. Dazu wurde das Plasmid pIP9 mit *Hind*III geschnitten und religiert. Die internen Erkennungssequenzen wichtiger Restriktionsendonukleasen des CagA-Moleküls sind schematisch in Abb. 13A dargestellt. Das resultierende Protein GSK-CagA $\Delta$ 57-587 (pIP29) wurde in *H. pylori* exprimiert. Infektionsexperimente zeigten, dass keine Translokation stattfindet (Abb. 13).

Nun sollten interne Deletionen im C-terminalen CagA-Bereich eingeführt werden, um hier eine Notwendigkeit interner Bereiche für die Translokation zu überprüfen. Dieser, für die Funktionalität von CagA nach der Translokation in die Zielzelle notwendige (EPIYA-Motive) Teil des CagA-Moleküls zeichnet sich durch interne *Bgl*II-Schnittstellen aus. Dies wurde zur Deletion der Aminosäurereste 614-1019 mittels *Bgl*II-Restriktion ausgenutzt (pIP30). Da auch dieses Konstrukt nicht translozierbar war, wurden, von einer kleinen Deletion mittels *Bgl*II-Restriktion im Bereich der Aminosäurereste 952-1019 (pWS270) ausgehend, schrittweise immer größere Bereiche (GSK-CagA $\Delta$ 868-1019 (pWS269), GSK-CagA $\Delta$ 783-1019 (pRL6) sowie GSK-CagA $\Delta$ 695-1019 (pRL5)) entfernt. Zur Konstruktion der Plasmide pRL5, pRL6 und pWS269 wurden die PCR-Produkte der Rückwärtsprimer WS322, WS323 und WS318 jeweils in Kombination mit dem Vorwärtsprimer WS158 nach *Bam*HI/*Cla*I Restriktion in das Plasmid pIP9 (*Bgl*II/*Cla*I) ligiert (vgl. auch Abb. 9).

Eine stabile Expression im *H. pylori*-Stamm P76 und AGS-Zell-Infektionen zeigten, dass diese internen Deletionen keinen Einfluss auf die Translozierbarkeit von CagA haben, wie deutlich aus der GSK-Phosphorylierung in Abb. 13B hervorgeht. Zusammenfassend scheint die Region um die Aminosäurereste 614 bis 695 notwendig zu sein, um CagA in einem translokationskompetenten Zustand zu halten.

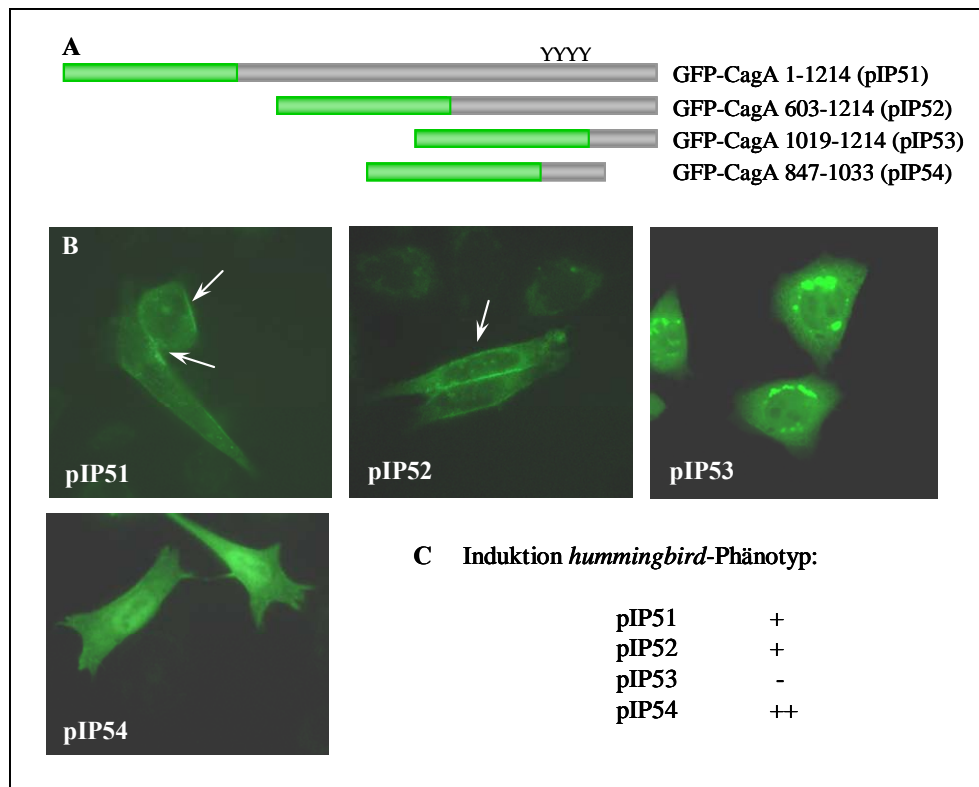


**Abb. 13: Einfluss interner Deletionen auf die CagA-Translokation. (A) Schematische Darstellung der verwendeten GSK-CagA-Varianten.** Gekennzeichnet sind interne HindIII sowie BglII-Schnittstellen. Punkte repräsentieren deletierte Molekülbereiche. Die EPIYA-Region ist mit YYY gekennzeichnet. **(B) Deletionen der Aminosäurereste 695 bis 1019 zeigen keinen Einfluss auf die CagA-Translokation.** Die beiden Moleküle GSK-CagAΔ614-1019 (pIP30) und GSK-CagAΔ57-587 (pIP29) hingegen werden bei Infektionsassays nicht ins Cytoplasma von AGS-Zellen sekretiert. Abgebildet sind mit Antiseren gegen GSK und P-GSK entwickelte Immunoblots von Infektionsansätzen, die über SDS-PAGE aufgetrennt wurden.

### 3 Funktionelle CagA-Domänen in Wirtszellen

#### 3.1 Untersuchungen zur Membranlokalisation von CagA

Nach erfolgter Translokation wird CagA in der Zielzelle an die Plasmamembran rekrutiert und an den Tyrosinresten der EPIYA-Region phosphoryliert (210,225). In der Literatur gibt es unterschiedliche Angaben, welche Teile des CagA-Moleküls für diese Membranlokalisation ausreichend sind (19,115). Aus diesem Grunde wurden das gesamte *cagA*-Gen sowie drei weitere Abschnitte des *cagA*-Gens (siehe Abb. 14A) in dem eukaryotischen Vektor pEYFP-C3 *in frame* mit dem *gfp*-Gen fusioniert. Dazu wurden die CagA-Varianten der Plasmide pIP9, pWS231, pIP8 sowie pIP48 über *Bam*HI/*Kpn*I bzw. *Bgl*II/*Kpn*I in den Vektor pEYFP-C3 subkloniert. Die resultierenden Plasmide pIP51, pIP52, pIP53 und pIP54 exprimieren das *gfp*-Gen fusioniert mit *cagA*, *cagA* (codons 602-1214), *cagA* (codons 1019-1214) bzw. *cagA* (codons 847-1033). 24 h nach Transfektion in AGS-Zellen wurden diese fixiert. Aus den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen in Abb. 14B geht hervor, dass das ganze CagA-Protein, sowie die C-terminale Hälfte eindeutig an der Zellmembran lokalisiert sind, während der interne Bereich (pIP54), der auch die EPIYA-Motive enthält, dazu nicht ausreicht. Die vorliegende cytoplasmatische und nukleäre Verteilung dieser Variante entspricht dem nicht fusionierten GFP-Molekül (vgl. Abb. 19). Das Fusionsprotein GFP-CagAΔ1019N (pIP53) hingegen zeigt eine eher punktförmige Verteilung, welche im perinukleären Bereich vorliegt und durch Aggregation bedingt sein könnte. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Regionen im Bereich zwischen Aminosäure 602 und 1019 notwendig sind, um das CagA-Molekül an die Membran zu rekrutieren. Die Aminosäuren 847 bis 1033 sind eventuell notwendig, aber nicht ausreichend. Eine Induktion des *hummingbird*-Phänotyps konnte durch Transfektion der Plasmide pIP51 und pIP52 beobachtet werden, überraschenderweise scheint pIP54 zu einer deutlich stärkeren Induktion zu führen. GFP-CagAΔ1019N hat keinerlei Auswirkungen auf die Organisation des Aktincytoskeletts.

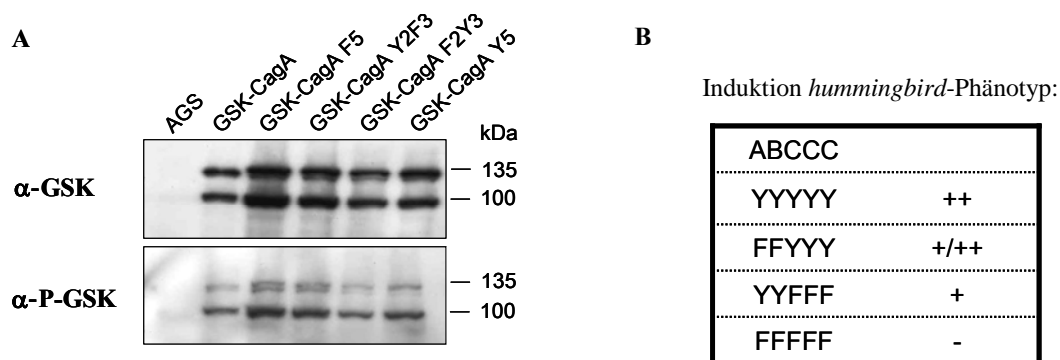


**Abb. 14: Membranlokalisationsdomänen von CagA.** (A) Schematische Darstellung der GFP-CagA-Fusionen. (B) Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nach Transfektion in AGS-Zellen. Expression und Lokalisation der GFP-CagA Varianten. (C) Induktion des *hummingbird*-Phänotyps.

### 3.2 Einfluss der EPIYA-Motive auf die CagA-Prozessierung

CagA wird über das Cag-T4SS in diverse Zielzellen, unter anderem in Makrophagen eingeschleust (163). In diesen phagocytischen Zellen kommt es zur Phosphorylierung und proteolytischen Spaltung des Proteins. Dabei entstehen ein 100 kDa- und ein phosphoryliertes 40 kDa-Fragment, welches den C-terminalen Bereich des CagA-Moleküls darstellt. In diesem Zusammenhang sollte nun anhand phosphorylierungsresistenter CagA-Varianten überprüft werden, ob die Tyrosinphosphorylierung der EPIYA-Motive für eine Prozessierung notwendig ist bzw. diese bedingt. Weiterhin sollte überprüft werden, ob die Tyrosinreste der EPIYA-Motive einen Einfluss auf die CagA-Translokation haben.

Zur Generierung entsprechender Konstrukte wurden CagA-Hybride aus der N-terminalen Hälfte des GSK-CagA<sub>P12</sub>-Fusionsproteins und der C-terminalen Hälfte entsprechender Varianten von mutiertem CagA<sub>11637</sub> hergestellt. Das CagA-Molekül des Stammes 11637 enthält 5 EPIYA Motive (ABCCC). Die verwendeten Varianten des CagA<sub>11637</sub>-Moleküls hatten entweder die Tyrosinreste aller EPIYA-Motive gegen Phenylalanin ausgetauscht, oder nur der Motive AB bzw. CCC. Zur Kontrolle wurde das *wt* Protein zur Hybridkonstruktion eingesetzt. Die mutierten CagA-Varianten des Stammes 11637 (153) wurden amplifiziert (WS179/WS265) und nach *Bgl*II/*Kpn*I-Restriktion in den Vektor pIP9 ligiert (vgl. Abb. 9). Die resultierenden Plasmide wurden über Konjugation in den *H. pylori*-Stamm P76 eingebracht, reisoliert und in den Stamm P12Δ*cagA* transformiert. Infektionsexperimente der Zelllinien J774.1 sowie THP-1 zeigten, dass die Prozessierung des CagA-Moleküls von einer Tyrosinphosphorylierung unabhängig ist. Kontrollexperimente mit AGS-Zellen zeigen eine unveränderte Translokation der mutierten CagA-Hybride im Vergleich mit dem *wt*-Protein. Die Induktion des *hummingbird*-Phänotyps wurde bei dem phosphorylierungsresistenten CagA-Hybrid-Protein (FFFFFF) nicht beobachtet (Abb. 15B). In Abb. 15A sind die mit α-GSK und α-P-GSK entwickelten Immunoblots einer J774.1-Infektion dargestellt.



**Abb. 15: (A) Einfluss einer Tyrosinphosphorylierung auf die CagA-Prozessierung in phagocytischen Zellen.** Abgebildet sind mit Antiseren gegen GSK und P-GSK entwickelte Immunoblots von J774.1-Infektionsansätzen, die über SDS-PAGE aufgetrennt wurden. Es sind die nicht prozessierten (135 kDa) und die prozessierten (100 kDa) CagA-Moleküle zu erkennen. **(B) Einfluss einer Tyrosinphosphorylierung auf die Induktion des *hummingbird*-Phänotyps in AGS-Zellen.**

## 4 Untersuchung von Kandidaten für weitere Effektorproteine

### 4.1 Identifizierung und Sequenzanalyse interessanter PAI-Genprodukte

Um mögliche weitere Effektorproteine des Cag-T4SS zu identifizieren, wurden einige offene Leserahmen (*open reading frames, orfs*) der *cag*-PAI genauer untersucht. Interessante Kandidaten sind Proteine, welche weder für den Aufbau des Typ IV-Sekretionssystems (IL-8 Induktion) noch für die CagA-Translokation notwendig sind (vgl. Einleitung, Abb. 4) (87). Anhand dieser ersten Parameter wurden zwei direkt an die linke PAI-Insertionsregion (*left junction*) angrenzend codierte Proteine ausgewählt. Zusätzlich schienen drei weitere, in der Mitte der PAI lokalisierte, *orfs* potentielle Kandidaten für PAI-codierte Effektoren darzustellen.

Zunächst wurden Sequenzvergleiche der Proteine Cag $\zeta$ ,  $\epsilon$ , S, Q und P aus verschiedenen Stämmen anhand bereits publizierter Daten durchgeführt (14,30,46,236). Hier zeigte sich, dass alle, bis auf das Protein Cag $\epsilon$ , konserviert vorliegen und sich weder in der Größe noch der Primärsequenz stark unterscheiden (Identität zwischen 95 % und 100 %). Cag $\epsilon$  (HP521) hingegen kann in zwei unterschiedlichen Formen vorliegen: HP521A und HP521B (28,30). Die beiden komplett sequenzierten *H. pylori*-Stämme 26695 und J99 codieren für die erste Variante, während einige Patientenisolat wie die Stämme Ca73 und Du23:2 HP521B exprimieren (30). Das Protein Cag $\epsilon$  ist im Stamm 26695 wesentlich kürzer, was durch eine Leserasterverschiebung zustande kommt und die Translation des Proteins vorzeitig beendet. Der Sequenzvergleich von HP521B und HP521A aus J99 zeigt, dass erstere Variante ungefähr 750 bp umfasst sowie Start und Stopcodon in einem anderen Leseraster aufweist. Ungefähr die Hälfte aller getesteten schwedischen *H. pylori*-Stämme enthalten das HP521B-Gen (30).

Das Protein Cag $\zeta$  wird, wie auch das CagA-Protein, zwischen der mittleren logarithmischen und der stationären Wachstumsphase, *in vitro* signifikant induziert (32,235,235). Die relative *in vivo* Expression der *cag*-PAI-Gene zeigt, dass *cag $\zeta$*  das Gen mit der zweithöchsten Expression ist. Verschiedene Parameter weisen darauf hin, dass die *in vivo* vorherrschende Wachstumsphase eher der stationären Phase entspricht (33).

Zusammengenommen sind diese Punkte ein Hinweis dafür, dass Cag $\zeta$  eine Virulenz-assoziierte Rolle in der *H. pylori*-Pathogenese spielen könnte.

Durch bioinformatische Suche nach bekannten Sequenzmotiven (4,80) wurde möglichen Funktionen bzw. Hinweisen auf eine Funktion nachgegangen. So konnten einige schwache Ähnlichkeiten mit Sequenzmotiven wie einer mit bakterieller Adhäsion assoziierten Big-1 Domäne im Protein Cag $\zeta$ , sowie möglichen Kernlokalisationssignalen der Proteine Cag $\epsilon$  und CagS identifiziert werden. Starke Homologien zeigte das Zinkfingermotiv des Proteins Cag $\epsilon$  zu bekannten Topoisomerasen. So könnte eine DNA-Interaktion eine mögliche Funktion dieses Proteins darstellen. Die Analyse der anderen Kandidatenproteine brachte keine Ähnlichkeit zu bekannten Proteinen oder Motiven.

Einige maßgebliche Eigenschaften der potentiellen Effektorproteine sind in Tabelle 13 zusammengefasst.

**Tab. 13: Überblick über die Eigenschaften einiger Kandidaten für weitere Effektorproteine**

Protein <sup>a</sup>	<sup>b</sup>	Stamm	Länge des Gens (bp)	Orientierung	Coiled-coil <sup>c</sup>	Bekannte Motive <sup>d</sup>
Cag $\zeta$	HP520	26695	345	+	nein	Big-1 Domäne (schwach), bakterielle Adhäsion, involviert in Pathogenese
Cag $\epsilon$	HP521	26695	240	+	nein	keine
Cag $\epsilon$	HP521 (JHP470)	J99	657	+	ja	Zinkfinger, Topoisomerase DNA-Bindung; Kernlokalisationssignal (schwach)
Cag $\epsilon$	HP521B	Ca73	750	+	schwach	DNA-Topoisomerase
CagS	HP534	26695	588	-	ja	CARD-Domäne, Kernlokalisationssignal (schwach)
CagQ	HP535	26695	378	-	nein	keine
CagP	HP536	26695	342	-	nein	keine

<sup>a</sup> Bezeichnung nach Censini *et al.*(46)

<sup>b</sup> Bezeichnung nach Tomb *et al.* (236)

<sup>c</sup> COILS: coiled-coil Vorhersagen (5)

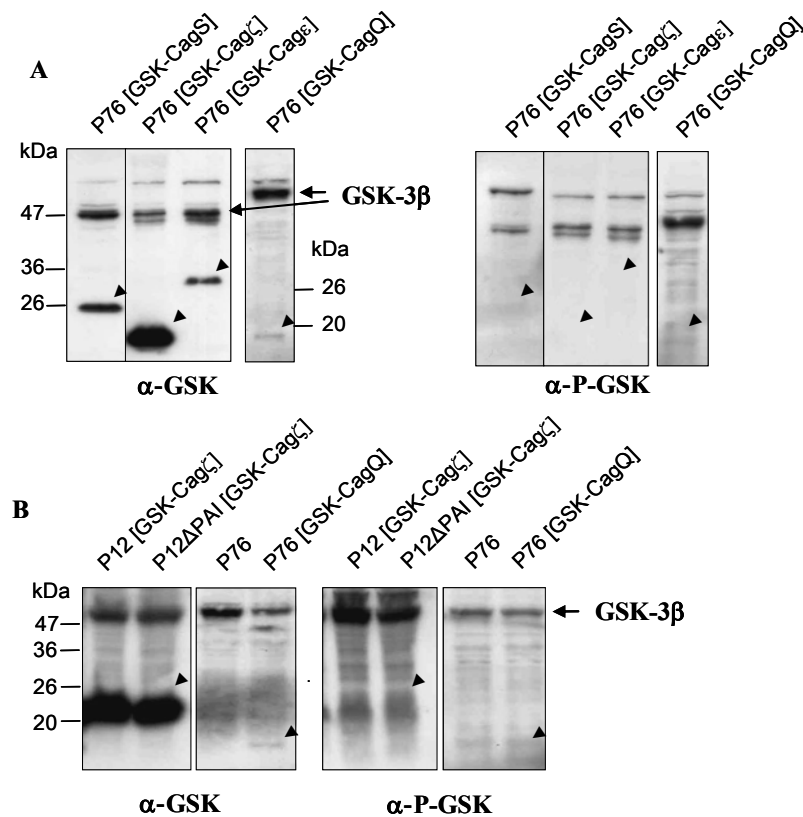
<sup>d</sup> Sequenzvergleiche mit bekannten Motiven (4,81)

## 4.2 Screening mit dem GSK-Reporterassay auf Proteintranslokation

Diese ausgewählten Kandidaten für Effektorproteine wurden zunächst mit Hilfe des GSK-Phosphorylierungsassays auf Translokation in Epithelzellen überprüft. Dazu wurden mit dem GSK-Expressionsvektor N-terminale Fusionen der Proteine Cag $\zeta$  (pIP24), Cag $\epsilon$  (pIP28), CagS (pIP14), CagP (pIP27) und CagQ mit dem GSK-Tag hergestellt. Da im *orf cagQ* möglicherweise ein alternatives Startcodon vorliegt, wurden hier zwei Konstrukte generiert (pIP25 und pIP26). Dabei wurden bei allen Genen die Sequenzen des Stammes 26695, zur Klonierung der Fusion *gsk-cag $\epsilon$*  die Sequenz des Stammes J99 verwendet (siehe 4.1). Die zur Amplifikation verwendeten Primer sind in Tabelle 5 aufgelistet. Eine schematische Darstellung der Konstrukte ist in Abb. 43 im Anhang abgebildet. Die PCR-Produkte wurden standardmäßig aufgereinigt, einer *Bgl*II/*Kpn*I-Restriktion unterzogen und über diese Restriktionsschnittstellen in den GSK-Expressionsvektor ligiert. Aufgrund einer internen *Bgl*II-Schnittstelle im Gen *cag $\epsilon$*  wurde hier die Restriktionsendonuklease *Bam*HI eingesetzt. Die Expression der GSK-Fusionsproteine GSK-CagS, GSK-Cag $\zeta$ , GSK-Cag $\epsilon$  und GSK-CagQ konnte in *E. coli* und auch in *H. pylori* gezeigt werden. Alle Fusionen wurden durch Sequenzierung verifiziert. Die GSK-Fusion mit dem Protein CagP wurde nicht exprimiert, eine Überprüfung der klonierten Sequenz ergab jedoch keinen Fehler. Weiterhin konnte das Konstrukt pIP26 nicht exprimiert werden.

In 4-stündigen Infektionsexperimenten mit AGS-Zellen konnte bei keinem der überprüften PAI-Proteine eine GSK-Phosphorylierung festgestellt werden (Abb. 16A). Eine Translokation der Fusionsproteine GSK-Cag $\zeta$  und GSK-CagQ wurde zusätzlich anhand der Mukus-produzierenden Epithelzelllinie St3051 überprüft. Dazu wurden die Stämme P12 und P12 $\Delta$ PAI, transformiert mit dem Plasmid pIP24, bzw. P76, transformiert mit pIP25, verwendet. Auch hier konnte keine Sekretion in das Wirtszellcytosol nachgewiesen werden (Abb. 16B). Die Expression des Proteins GSK-CagQ war in Infektionen leider trotz mehrmaliger Wiederholung sehr schwach. Eine Translokation kann nicht hundertprozentig ausgeschlossen werden, da durch die geringe Proteinmenge die Nachweisgrenze dieses Testsystems erreicht ist.

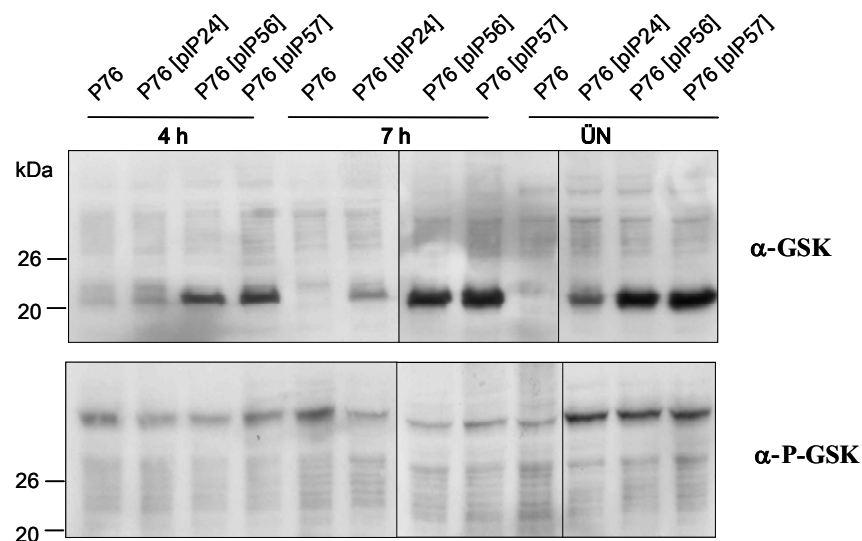




**Abb. 16: GSK-Infektionsassay mit den GSK-getaggtten Proteinen Cag $\zeta$ , Cag $\epsilon$ , CagS und CagQ.** Abgebildet sind Infektionen von AGS-Zellen (A) sowie der Mukus-produzierenden Zelllinie St3051 (B). Dabei wurde für 4 h mit einer MOI von 100 infiziert. Die Lysate der Infektionsansätze wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und der Western Blot mit  $\alpha$ -GSK- bzw.  $\alpha$ -P-GSK-Antiseren entwickelt. Zelluläre GSK-3 $\beta$  ist mit Pfeilen markiert.

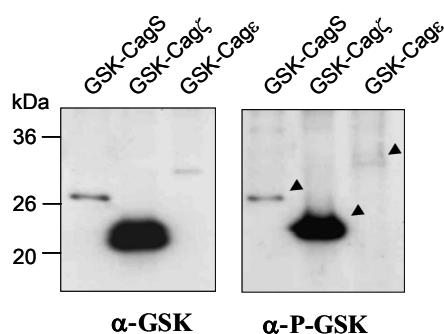
Die Expression und Stabilität von Effektorproteinen und evtl. notwendigen Chaperonen wird möglicherweise stark reguliert und könnte abhängig sein von Faktoren wie Wachstumsphase oder Zellkontakt. Aufgrund dessen wurde das Protein Cag $\zeta$  (HP520), das wie erwähnt wachstumsphasenabhängig reguliert wird, unter der Kontrolle der eigenen Promotorregion wiederum auf einem *shuttle-vector* exprimiert. In diesem Fall wurden sowohl eine N- als auch eine C-terminale Fusion mit dem GSK-Tag hergestellt. Die *cag $\zeta$* -Promotorregion wurde mit Hilfe der Primer WS327 und WS328 von chromosomaler DNA des Stammes 26695 amplifiziert und über *Cla*I/*Nde*I in den Vektor pIP24 kloniert. Für die C-terminale Fusion erfolgte die Amplifikation mit den Primern WS327/WS329. Das erhaltene PCR-Produkt wurde über *Cla*I und *Kpn*I-Restriktionsschnittstellen in den GSK-Expressionsvektor ligiert.

Die resultierenden Plasmide pIP57 (GSK-Cag $\zeta$ ) bzw. pIP56 (Cag $\zeta$ -GSK) wurden in dem *H. pylori*-Stamm P76 exprimiert und Infektionsexperimente über Zeiträume von 4 h, 7 h und über Nacht durchgeführt. Die Überprüfung der Zelllysate in Immunoblots mit Antiseren gegen GSK und P-GSK ergab, dass unter den getesteten Bedingungen keine Translokation des Proteins Cag $\zeta$  stattfindet. Bei allen im Abschnitt 4.2 beschriebenen Infektionsexperimenten wurden GSK-CagA produzierende *H. pylori*-Stämme als Positivkontrolle mitgeführt.



**Abb. 17:** Infektionsexperimente der *H. pylori*-Stämme P76 [pIP56] und P76 [pIP57], die *gsk-cag $\zeta$*  unter Kontrolle des *cag $\zeta$* -Promoters exprimieren. Zur Kontrolle wurden die Stämme P76 und P76 [pIP24] eingesetzt. Abgebildet sind Infektionen von AGS-Zellen, die für 4 h, 7 h und über Nacht (ÜN) infiziert wurden. Die Lysate der Infektionsansätze wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und der Western Blot mit  $\alpha$ -GSK- bzw.  $\alpha$ -P-GSK-Antiseren entwickelt.

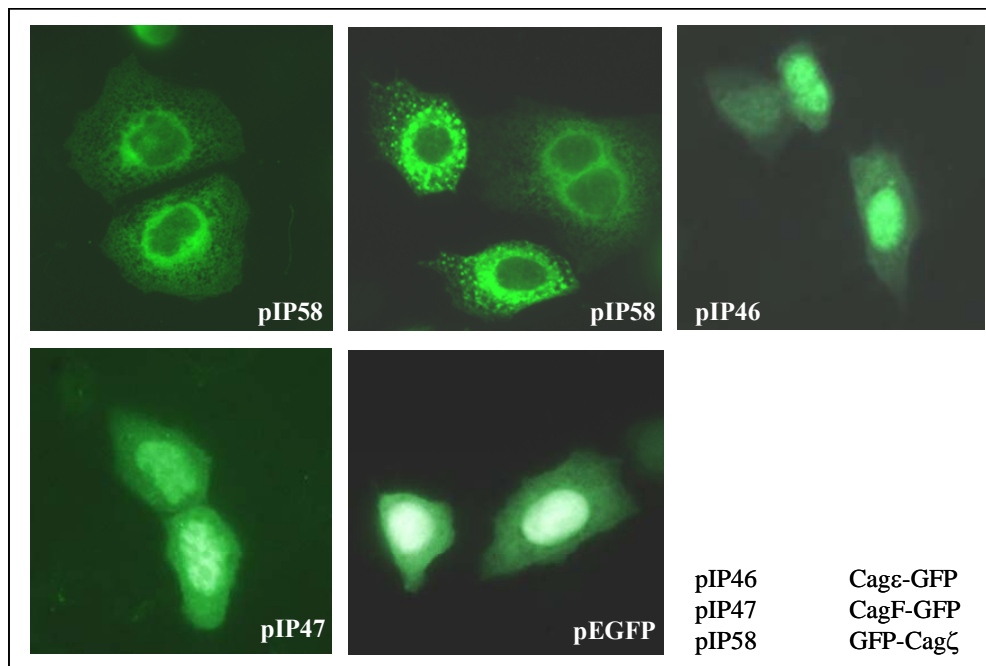
Um sicherzustellen, dass der GSK-Tag der Fusionskonstrukte für zelluläre Kinasen zugänglich ist, wurden *in vitro*-Phosphorylierungsexperimente mit AGS-Zelllysaten durchgeführt. In Abb. 18 ist zu erkennen, dass nach Inkubation mit AGS-Zelllysate die getesteten GSK-Fusionsproteine Cag $\zeta$ , Cag $\epsilon$  und CagS *in vitro* GSK-phosphorylierbar sind.



**Abb. 18:** *In vitro*-Phosphorylierung der GSK-getaggten Proteine Cag $\zeta$ , Cag $\epsilon$  und CagS. Durch Inkubation der Bakterienlysate mit AGS-Zelllysaten kann der Serin-Rest an Position 9 des GSK-Tags phosphoryliert werden. Dies bestätigt, dass die getesteten Konstrukte aufgrund ihrer Struktur für zelluläre Kinasen zugänglich sind. Abgebildet sind Immunoblots gegen GSK und P-GSK.

### 4.3 Lokalisation in AGS-Zellen nach Transfektion

Da bisher nur gezeigt werden konnte, dass eine GSK-Tag-Phosphorylierung in cytosolischen Kompartimenten stattfindet, ist eine fehlende GSK-Phosphorylierung kein endgültiger Beweis für eine fehlende Translokation. Daher sollte nun überprüft werden, welche Lokalisation mögliche Effektorproteine nach Transfektion in der eukaryotischen Zelle einnehmen. Dazu wurden die Proteine Cag $\epsilon$  und zur Kontrolle das nicht translozierte Chaperon CagF (siehe Abschnitt 5.3) C-terminal mit GFP fusioniert, indem die entsprechenden Gene in den eukaryotischen Expressionsvektor pEGFP-N1 kloniert wurden. Zusätzlich wurde auch das Protein Cag $\zeta$  an den C-Terminus des *green fluorescent protein* fusioniert. Hierzu wurde das PCR-Produkt (Primer siehe Tab. 5) ohne Startcodon in den Vektor pEYFP-C3 ligiert. Nach Transfektion von AGS-Zellen konnte die Lokalisation fluoreszenzmikroskopisch untersucht werden. Als Kontrolle wurde der Vektor pEGFP ohne inseriertes Fragment verwendet. Dabei zeigte sich, dass CagF-GFP als bakterielles Protein einen toxischen Effekt auf eukaryotische Zellen zu haben scheint. Fast alle transfizierten Zellen waren innerhalb von 24 h apoptotisch. Einige wenige zeigten eine gleichmäßige Verteilung des Fusionsproteins im Cytoplasma. Das Fusionsprotein Cag $\epsilon$ -GFP liegt, wie GFP alleine auch, ubiquitär, in Kern und Cytoplasma, in der Zelle vor. Eine bevorzugte Lokalisation im Kern lässt sich nicht feststellen. Weiterhin ist in Abb. 19 die zelluläre Lokalisation des Proteins GFP-Cag $\zeta$  nach Transfektion abgebildet. Die Transfektionseffizienz betrug hier ca. 60 % und die Zellen zeigten keinerlei veränderte Morphologie. 24 h nach Transfektion konnten zwei unterschiedliche mikroskopische Bilder beobachtet werden. Bei der Lokalisation des Fusionsproteins handelt es sich möglicherweise um Strukturen des endoplasmatischen Retikulums (ER). Eine genauere Aussage wäre allerdings nur durch eine Colokalisation mit den entsprechenden zellulären Markern möglich.



**Abb. 19: Lokalisation von CagE-GFP, GFP-CagZ, CagF-GFP und GFP in AGS-Zellen.** Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen 24 h nach Transfektion in AGS-Zellen. Expression und Lokalisation der GFP-Fusionsproteine und GFP alleine.

## 5 Interaktion von CagA mit seinem Sekretions-Chaperon CagF

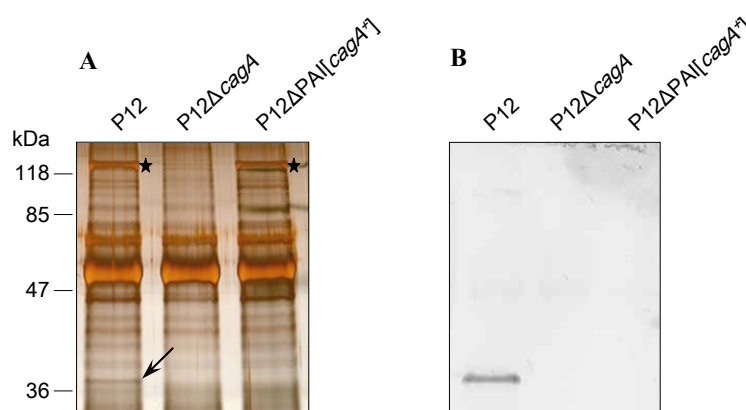
### 5.1 Identifizierung eines mit CagA interagierenden Proteins: CagF

Im komplexen Translokationsprozess interagiert CagA vermutlich mit verschiedenen Apparatskomponenten und anderen Faktoren, die für die Substraterkennung notwendig sind und/oder Chaperonfunktionen erfüllen. Diese für die Translokation essentiellen Proteine sind höchstwahrscheinlich ebenfalls auf der *cag*-Pathogenitätsinsel codiert.

Um *cag*-PAI-codierte Interaktionspartner des CagA-Proteins zu identifizieren, wurde CagA aus Zellextrakten des Wildtyp-Stammes P12, der isogenen *cagA*-Deletionsmutante und einer isogenen, CagA von einem „shuttle-vector“ (pJP55) exprimierenden PAI-Mutante mit Hilfe des Antikörpers AK257 immunpräzipitiert. Die Immunpräzipitate wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und das Polyacrylamidgel anschließend silbergefärbt.

Wie in Abb. 20 gezeigt, wurde ein Protein einer Größe von 36 kDa im *wt*-Stamm, nicht aber in der *cagA*-Mutante co-präzipitiert. Dies zeigt, dass es sich hier um eine spezifische Interaktion handelt und es nicht durch Kreuzreaktion mit dem  $\alpha$ -CagA-Antikörper zu einer unspezifischen Wechselwirkung kommt. Eine fehlende Präzipitation im Stamm P12 $\Delta$ PAI [*cagA*<sup>+</sup>] zeigt, dass es sich hierbei um ein *cag*-PAI-codiertes Protein handelt.

Durch Western Blot und Immundetektion mit Hilfe von Antiseren gegen verschiedene PAI-Proteine, z. B.  $\alpha$ -Cag $\alpha$ ,  $\alpha$ -CagT,  $\alpha$ -CagF, konnte das CagA-interagierende Protein als CagF (HP0543) identifiziert werden (Abb. 20).



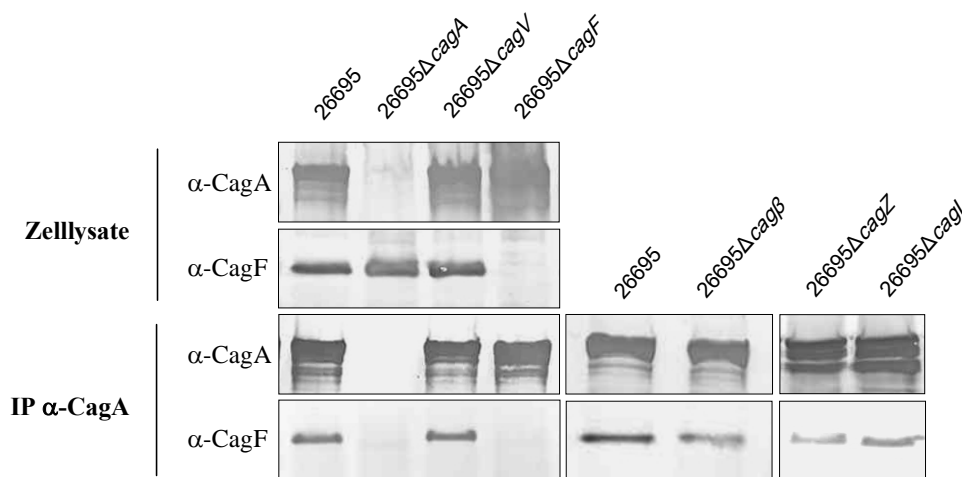
**Abb. 20: CagF ist der hauptsächliche Interaktionspartner von CagA.** (A) Immunpräzipitation von CagA in P12, P12 $\Delta$ *cagA*, P12 $\Delta$ PAI [*cagA*<sup>+</sup>]. Die Silberfärbung zeigt die Präzipitation von CagA (Stern) und ein co-präzipitiertes *cag*PAI-codiertes Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 36 kDa (Pfeil). (B) Identifizierung des interagierenden Proteins als CagF. Immunoblot mit einem polyklonalen CagF Antiserum (AK284).

Diese im Stamm P12 gezeigte Interaktion konnte ebenfalls im Stamm 26695 reproduziert werden. Hierzu wurde die Immunpräzipitation mit Bakterienzellslysaten der *H. pylori*-Stämme 26695, 26695 $\Delta$ *cagA* und 26695 $\Delta$ *cagF* durchgeführt (Abb. 21)

## 5.2 Einfluss weiterer PAI-Proteine auf die Interaktion CagA-CagF

Um zu überprüfen, ob die beschriebene Interaktion abhängig ist von anderen PAI-codierten Proteinen, wurden weitere Immunpräzipitationen mit dem CagA-Antikörper AK257 durchgeführt. Um der Frage nachzugehen, ob diese Interaktion von einem funktionellen Sekretionsapparat abhängt, wurde zunächst eine *cagV*-Mutante des Stammes 26695 eingesetzt, welche in sowohl der CagA-Translokation als auch der IL-8 Induktion defizient ist.

Der Einfluss der Translokationsfaktoren CagI, CagZ und Cag $\beta$  wurde durch CagA-Immunpräzipitation in den entsprechenden 26695-Mutanten getestet. Abb. 21 zeigt, dass die Menge an mit CagA co-präzipitiertem CagF in allen Mutanten unverändert ist gegenüber dem Wildtyp. Die Interaktion zwischen CagA und CagF scheint somit unabhängig zu sein von einem funktionellen Sekretionsapparat und den Translokationsfaktoren.

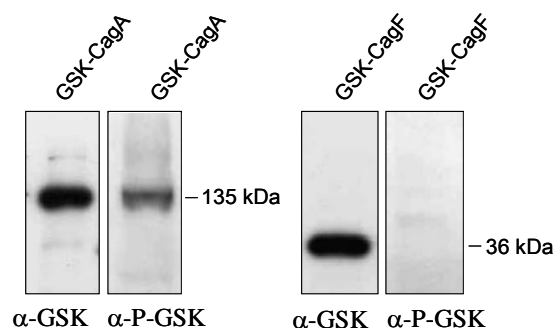


**Abb. 21: Die Interaktion CagA-CagF ist unabhängig von einem funktionellen T4SS und den Translokationsfaktoren CagI, CagZ und Cag $\beta$ .** Immunpräzipitation von CagA in 26695, 26695 $\Delta$ cagA, 26695 $\Delta$ cagF, 26695 $\Delta$ cagV, 26695 $\Delta$ cagI, 26695 $\Delta$ cagZ und 26695 $\Delta$ cag $\beta$ . Dargestellt sind die Startextrakte und die Präzipitate, die nach SDS-PAGE und Western Blot mit Antiseren gegen CagA und CagF entwickelt wurden.

### 5.3 Ist CagF ein Substrat für Translokation?

Die Frage, ob es sich bei CagF selbst um ein Substrat für die Translokation, eventuell im Komplex mit CagA, handeln könnte, wurde mit Hilfe des GSK-Reporterassays geklärt. Dazu wurde eine N-terminale Fusion des GSK-Tags mit CagF hergestellt. Zunächst wurde das Gen *hp543* mit Hilfe der Primer WS215 und WS216 ohne Startcodon von chromosomaler DNA des *H. pylori*-Stammes 26695 amplifiziert und über *Bgl*II und *Kpn*I-Schnittstellen in den GSK-Expressionsvektor ligiert. Der resultierende, GSK-CagF unter Kontrolle des *cagA*-Promotors exprimierende, *shuttle-vector* pIP15 wurde über Konjugation in den *H. pylori*-Stamm P76 eingebracht.

Nachdem die Expression des Fusionsproteins überprüft worden war, wurden Infektionsexperimente mit AGS-Zellen durchgeführt und anschließend eine Phosphorylierung des GSK-Tags mittels SDS-PAGE, Western Blot und Immundetektion mit einem  $\alpha$ -Phospho-GSK Antikörper überprüft. In drei unabhängigen Experimenten konnte keine GSK-Phosphorylierung des Fusionsproteins nachgewiesen werden (Abb. 22).



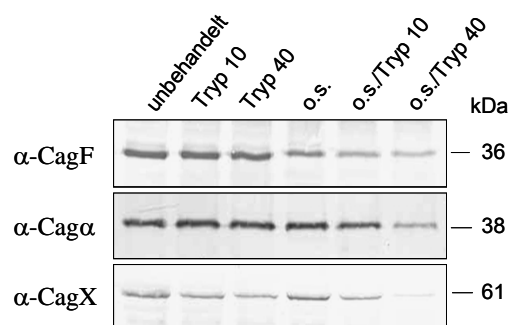
**Abb. 22: CagF ist kein Substrat des Cag-Typ IV-Sekretionssystems.** Infektion von AGS-Zellen mit GSK-CagA bzw. GSK-CagF exprimierenden *H. pylori*-Stämmen. Die Lysate der Infektionsansätze wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und der Western Blot mit  $\alpha$ -GSK bzw.  $\alpha$ -PGSK Antiseren entwickelt. GSK-CagA und GSK-CagF werden gut exprimiert ( $\alpha$ -GSK), es ist jedoch nur bei GSK-CagA eine Phosphorylierung erkennbar.

### 5.4 Lokalisation von CagF in der bakteriellen Zelle

Von entscheidendem Interesse war, wo CagF in der bakteriellen Zelle lokalisiert ist. Für eine Funktion als Sekretions-Chaperon wäre eine cytoplasmatische Lokalisation naheliegend. In *H. pylori* ist eine klare Trennung von IM und OM schwierig (34). Aus diesem Grunde wurden verschiedene biochemische Fraktionierungsmethoden eingesetzt, um die Lokalisation möglichst exakt beschreiben zu können.

### 5.4.1 Osmotischer Schock und Proteasebehandlung

Zunächst sollte festgestellt werden, ob CagF auf der Zelloberfläche (50), im Periplasma oder im Cytoplasma vorliegt. Dazu wurden unbehandelte *H. pylori*-Zellen, Zellen nach osmotischem Schock sowie Zelllysate einer Trypsinbehandlung unterzogen. Die Behandlung mit der Protease erfolgte 10 min mit 10 oder 40 µg/ml Trypsin. Immunoblots mit Antiseren gegen CagX (periplasmatisch, assoziiert mit OM), Cagα (cytoplasmatisch, assoziiert mit CM) sowie CagF zeigen, dass die cytoplasmatische Membran während des osmotischen Schocks überwiegend intakt geblieben ist und die Protease nur zum periplasmatischen Raum Zugang hatte. CagF scheint nach dem osmotischen Schock größtenteils vor proteolytischem Abbau geschützt zu sein, was auf eine cytoplasmatische Lokalisation hindeutet. In den bakteriellen Zelllysaten erfolgte ein kompletter Abbau der Proteine (nicht abgebildet).



**Abb. 23: Lokalisation von CagF: Proteasebehandlung von *H. pylori*-Zellen mit und ohne osmotischen Schock.** Ganze Zellen und Zellen nach osmotischem Schock wurden mit 0, 10 oder 40 µg Trypsin pro ml behandelt, über SDS-PAGE aufgetrennt und im Immunoblot mit den Antikörpern α-CagF, α-CagX und α-Cagα detektiert. o.s.: osmotischer Schock, Tryp 10 (40) Trypsinbehandlung mit 10 (40) µg/ml.

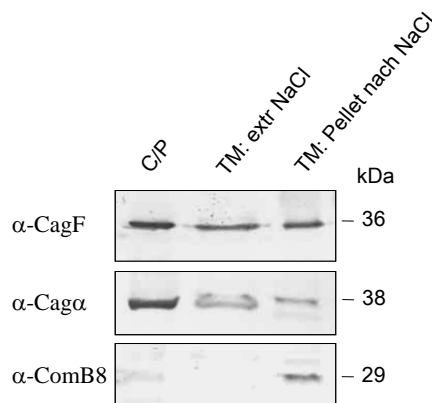
### 5.4.2 Zellfraktionierung und NaCl-Extraktion

Die Zellfraktionierung in eine Gesamtmembranfraktion (TM) und eine lösliche Fraktion (C/P) erlaubt eine Einteilung der Proteine in Membranproteine bzw. membranassoziierte Proteine und lösliche Proteine des Cytoplasmas oder Periplasmas. Nach Zelllyse und Abtrennung nicht aufgeschlossener Bakterienzellen wurden durch Ultrazentrifugation des Extraktes Membranen von der löslichen Fraktion abgetrennt.



Eine Auftrennung über SDS-PAGE und Immunoblotanalysen mit den entsprechenden Antikörpern zeigten, dass CagF und auch Cag $\alpha$  teilweise in löslicher Form und teilweise membrangebunden vorliegen. Das mit der Cytoplasmamembran assoziierte ComB8 (116) hingegen war in der löslichen Fraktion nicht enthalten.

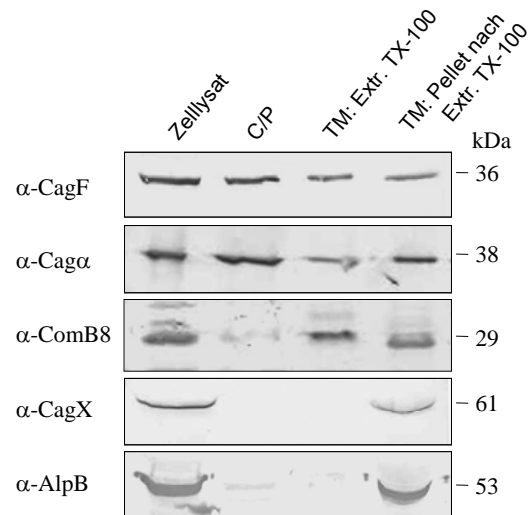
Zur Unterscheidung, ob es sich bei CagF um ein peripheres oder integrales Membranprotein handelt, wurde die Gesamtmembranfraktion präpariert und anschließend mit 1 M NaCl-Lösung inkubiert. CagF und auch Cag $\alpha$  konnten extrahiert werden, während das integrale Membranprotein ComB8 (116) unter den gleichen Bedingungen membrangebunden blieb.



**Abb. 24: Lokalisation von CagF: Zellfraktionierung und NaCl-Extraktion.** Aus Bakterienzelllysaten wurden die Gesamtmembranfraktion (TM) und die lösliche Fraktion (C/P) präpariert. Die TM-Fraktion wurde mit 1 M NaCl extrahiert und die erhaltenen Fraktionen mittels SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und mit den entsprechenden Antikörpern behandelt.

### 5.4.3 Solubilisierung in Triton X-100

Proteine der äußeren Membran von *E. coli* können nicht durch Triton X-100 in Lösung gebracht werden (160). Dadurch ist es möglich zu unterscheiden, ob das untersuchte Protein in der äußeren Membran lokalisiert ist oder nicht. Die Durchführung erfolgte wie unter 2.1.9.3 beschrieben. Mit dieser Extraktionsmethode konnten das mit der cytoplasmatischen Membran assoziierte Protein Cag $\alpha$  sowie das integrale Membranprotein ComB8 in Lösung gebracht werden (Abb. 25). Proteine der äußeren Membran, CagX und AlpB, waren hingegen nicht löslich. Nach Validierung des Verfahrens mit den beschriebenen Markern wurde das Verhalten des Proteins CagF überprüft. Hier konnte gezeigt werden, dass CagF durch Triton X-100 teilweise in Lösung gebracht wird.



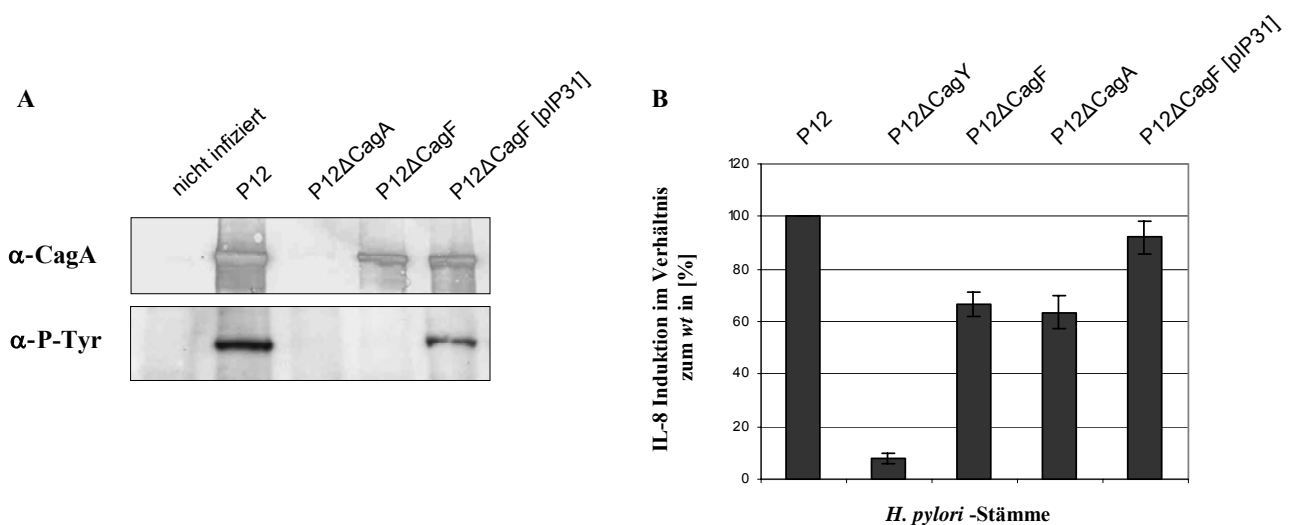
**Abb. 25: Lokalisation von CagF: Zellfraktionierung und Solubilisierung mit Triton X-100.** Aus Bakterienzelllysaten wurden die Gesamtmembranfraktion (TM) und die lösliche Fraktion (C/P) präpariert. Extraktion der TM-Fraktion mit Triton X-100 (TX-100). Aufgetragen sind Gesamtzelllysate, lösliche Fraktion (C/P), lösliche Fraktion nach TX-100 Extraktion und Ultrazentrifugation sowie die nicht TX-100 löslichen Proteine. Die erhaltenen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und mit den angegebenen Antikörpern behandelt.

## 5.5 Herstellung einer funktionellen GFP-Fusion mit CagF

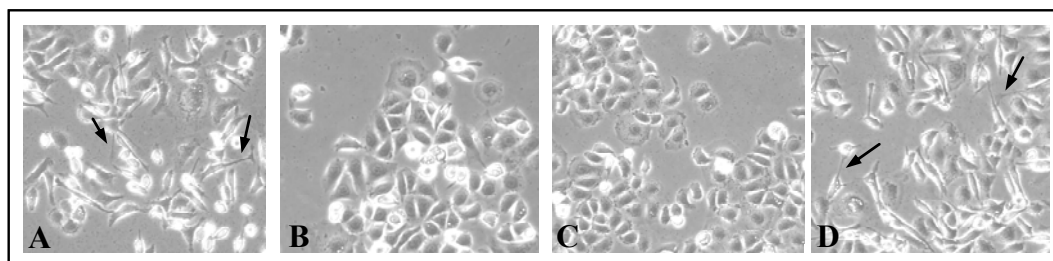
Um eine funktionelle CagF-GFP-Fusion zur Komplementierung des Stammes P12 $\Delta$ cagF herzustellen, wurde ein Plasmid zur chromosomalen Integration von Genen in den *recA*-Locus verwendet (pJP99) (185). Dabei wird das gewünschte Konstrukt, in diesem Falle eine *in-frame* Fusion von *cagF* und *gfp* unter Kontrolle des  $P_{cagA}$ , zusammen mit einer Kanamycin-Resistenzkassette (*aphA-3*) zwischen flankierende Bereiche des *recA*-Gens kloniert. Durch homologe Rekombination kann eine Integration in das Chromosom erfolgen.

Zur Generierung des Plasmides pIP31 wurde das *cagF*-Gen mit Hilfe der Oligonukleotide WS286 und WS287 von chromosomaler DNA amplifiziert und mit *SpeI*/*Bgl*II verdaut. Das *gfp*-Gen wurde ohne Startcodon mit Hilfe der Primer WS79 und WS80 von dem Plasmid pGFPMut-2 (57) amplifiziert und einer *Bgl*II/*Kpn*I Restriktion unterzogen. Anschließend wurden beide Fragmente *in-frame* in die *SpeI*/*Kpn*I Schnittstellen des Vektors pWS241, einem Derivat von pJP99, unter Kontrolle des *cagA*-Promotors kloniert. Nach Transformation in *E. coli* und Reisolierung wurde pIP31 in die *H. pylori*-Stämme P12, P12 $\Delta$ cagF, P12 $\Delta$ cagA (P17) und P12 $\Delta$ cag $\beta$  transformiert.

Nach erfolgreicher Transformation in P12 $\Delta$ cagF wurde dieser Stamm auf funktionelle Komplementation getestet. Dazu wurden Standardinfektionen mit AGS-Zellen durchgeführt und diese auf CagA-Tyrosinphosphorylierung sowie den *hummingbird*-Phänotyp und die im Stamm P12 CagA-abhängige IL-8 Induktion überprüft. Durch Transformation mit dem Plasmid pIP31 konnte der Defekt in der CagA-Translokation komplementiert werden, was sich im Vergleich der Infektionsansätze P12, P12 $\Delta$ cagA, P12 $\Delta$ cagF sowie P12 $\Delta$ cagF [pIP31] zeigt. Bei allen drei überprüften Parametern wurde eine Wiederherstellung des *wt*-Phänotyps beobachtet (Abb. 26 und 27).



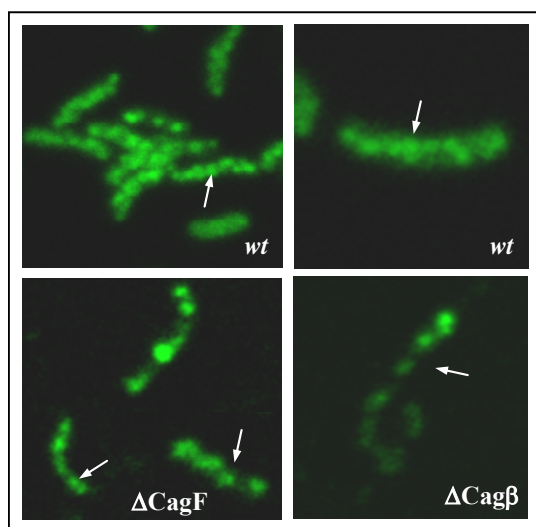
**Abb. 26: Komplementation der *cagF*-Mutante mit *cagF-gfp*: CagA-Tyrosinphosphorylierung und IL-8 Induktion.** In Infektionsexperimenten mit AGS-Zellen mit den angegebenen *H. pylori*-Stämmen konnte der Defekt der CagA-Translokation des Stammes P12 $\Delta$ cagF durch CagF-GFP aufgehoben werden. Dargestellt sind CagA-Tyrosinphosphorylierung (A) sowie IL-8 Induktion (B).



**Abb. 27: Komplementation der *cagF*-Mutante mit *cagF-gfp*: *hummingbird*-Phänotyp.** In Infektionsexperimenten mit AGS-Zellen mit den *H. pylori*-Stämmen P12 (A), P12 $\Delta$ cagF (B), P12 $\Delta$ cagA (C) und P12 $\Delta$ cagF [pIP31] (D) konnte der Defekt der CagA-Translokation des Stammes P12 $\Delta$ cagF durch CagF-GFP komplementiert werden.

Die Funktionalität des Fusionsproteins konnte zusätzlich durch Immunpräzipitation von CagA und einer Co-Präzipitation von CagF-GFP bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

Mikroskopische Aufnahmen sollten einen Einblick in die Lokalisation von GFP-CagF geben. Zusätzlich wurde überprüft, ob diese von dem Kopplungsprotein Cag $\beta$  abhängt. Abb. 28 zeigt, dass das CagF-GFP-Fusionsprotein teilweise im Cytoplasma verteilt ist, aber hauptsächlich in definierten Spots an der bakteriellen Zellmembran vorliegt. Bei einem Vergleich der unterschiedlichen *cagF-gfp* exprimierenden Stämme zeigt sich keine Veränderung der Lokalisation.

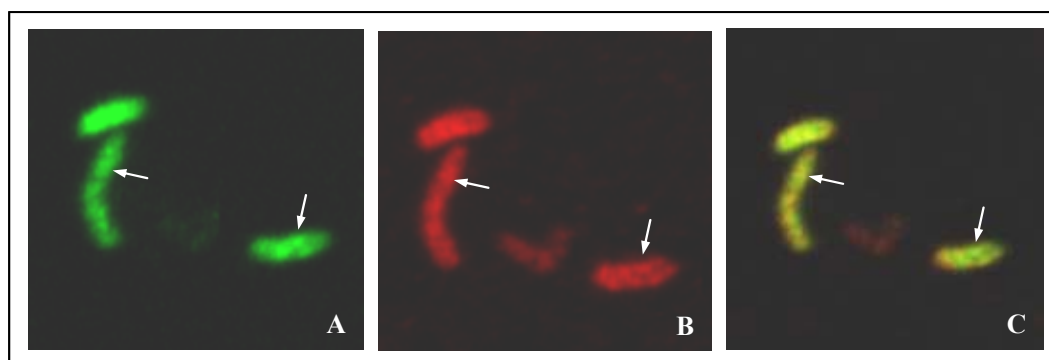


**Abb. 28: Verteilung von CagF in der bakteriellen Zelle.** Abgebildet sind konfokale Aufnahmen der Stämme P12 [pIP31], P12 $\Delta cag\beta$  [pIP31], P12 $\Delta cagF$  [pIP31]. Fleckenförmige Lokalisation des funktionellen CagF-GFP.

Zusätzlich wurde versucht, durch Immunfluoreszenzfärbung eines Cag-Apparatproteins (CagY bzw. CagT) eine Colokalisation von CagF mit dem T4SS nachzuweisen. Aufgrund der eher diffusen Emission des GFP und starker Unterschiede in den Fluoreszenzintensitäten konnten hier keine verlässlichen Aussagen getroffen werden (nicht dargestellt).

## 5.6 Colokalisation von CagF mit dem Apparatsprotein CagT mittels Doppel-Immunfluoreszenz

Die technischen Schwierigkeiten des Nachweises einer Colokalisation von CagF-GFP und einem fluoreszenzdetektierten Apparatprotein, z. B. CagT (190) wurden mittels Doppelimmunfluoreszenzfärbung umgangen. Dabei wurde ein N-terminal m45-getaggtetes CagF-Protein (pWS214) in einem *H. pylori* wt-Stamm exprimiert. Bei dem m45-Tag handelt es sich um einen Sequenzbereich des M45-Epitops des adenoviralen E4-6/7 Proteins (162). Die Bakterien wurden mit PFA fixiert und mit Hilfe von Lysozym und Triton X-100 permeabilisiert. Nach Absättigung unspezifischer Bindestellen erfolgte die Immundetektion mit den Antiseren  $\alpha$ -m45 und  $\alpha$ -CagT. Die Detektion wurde mit Alexa-gekoppelten Zweitantikörpern durchgeführt. So wurde zur Anfärbung des m45-CagF Fusionsproteins ein  $\alpha$ -Maus Alexa Fluor<sup>488</sup>-gekoppelter und zur Detektion von CagT ein  $\alpha$ -Kaninchen Alexa Fluor<sup>555</sup>-gekoppelter Sekundärantikörper eingesetzt. Die konfokalen Aufnahmen wurden mit einem Laserscanning-Mikroskop angefertigt. Die Bearbeitung der Bilddateien erfolgte mit dem Programm MetaMorph. Wie auch als GFP-Fusion in Abb. 28 scheint CagF hier ebenfalls in fleckenförmiger Verteilung vorzuliegen. Die Doppelfärbung in Abb. 29 zeigt weiterhin deutlich, dass CagF zumindest teilweise mit dem Cag-Sekretionsapparat colokalisiert vorliegt.



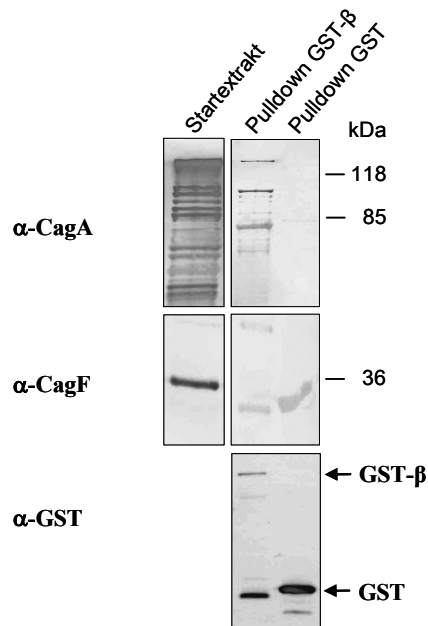
**Abb. 29: Colokalisation von m45-CagF und CagT.** Detektion mit einem primären Antikörper gegen den m45-Tag und Alexa Fluor<sup>488</sup>-gekoppelten Sekundärantikörper (A), bzw. einem primären Antikörper gegen das CagT-Protein und einem Alexa Fluor<sup>555</sup>-gekoppelten Sekundärantikörper (B). Das Übereinanderlegen der beiden Abbildungen zeigt die Colokalisation (Pfeile) (C).

## 5.7 Test auf Interaktion mit dem Kopplungsprotein Cag $\beta$

In weiteren Versuchen sollte die gezeigte Lokalisation von CagF in räumlicher Nähe des Typ IV-Sekretionssystems auch biochemisch verifiziert werden. Die Substraterkennung ist einer der Schlüsselmomente im Translokationsprozess. Hier entscheidet sich, ob ein Protein dem Kanal zugeführt wird oder nicht. Seit Jahren wird kontrovers die Beteiligung einer bestimmten Gruppe von Proteinen diskutiert. Kopplungsproteine (VirD4-Homologe) sollen an der Substraterkennung, evtl. an der Entfaltung und/oder am Transport über die innere Membran ins Periplasma beteiligt sein. Das VirD4-homologe Protein im *H. pylori* Cag-T4SS ist Cag $\beta$  (HP524).

Eine Interaktion des Kopplungsproteins Cag $\beta$  mit CagF und auch mit CagA nachzuweisen, wurde zunächst mittels BiFC-Komplementation (vgl. 5.10.2) versucht. Dieser experimentelle Ansatz schlug fehl, da das Cag $\beta$ -GFP-Hybrid unspezifisch mit dem nicht fusionierten komplementären GFP-Fragment interagierte.

Aus diesem Grunde wurde die Methode des GST-*pulldowns* eingesetzt. Dazu wurde das *cag $\beta$* -Gen zunächst ohne Startcodon *in frame* an das *gst*-Gen (pGEX4T-3) fusioniert. Die Expression erfolgte mit dem Stamm BL21DE3 bei 27°C, da das Fusionsprotein schwach exprimiert und bei höheren Temperaturen stark abgebaut wurde. Nach erfolgter Reinigung über Affinitätschromatographie wurde das Fusionsprotein, gekoppelt an Glutathion-Sepharose für *pulldown*-Assays in *H. pylori*-Bakterienzelllysaten eingesetzt. Hier konnte eine spezifische Interaktion zwischen GST-Cag $\beta$  und dem CagA-Protein gezeigt werden. Aus Abb. 30 geht hervor, dass CagA mit GST-Cag $\beta$  präzipitiert, nicht jedoch mit GST alleine. Während die Interaktion mit CagA reproduzierbar nachweisbar war, konnte in diesen Versuchen jedoch keine Präzipitation von CagF gezeigt werden.

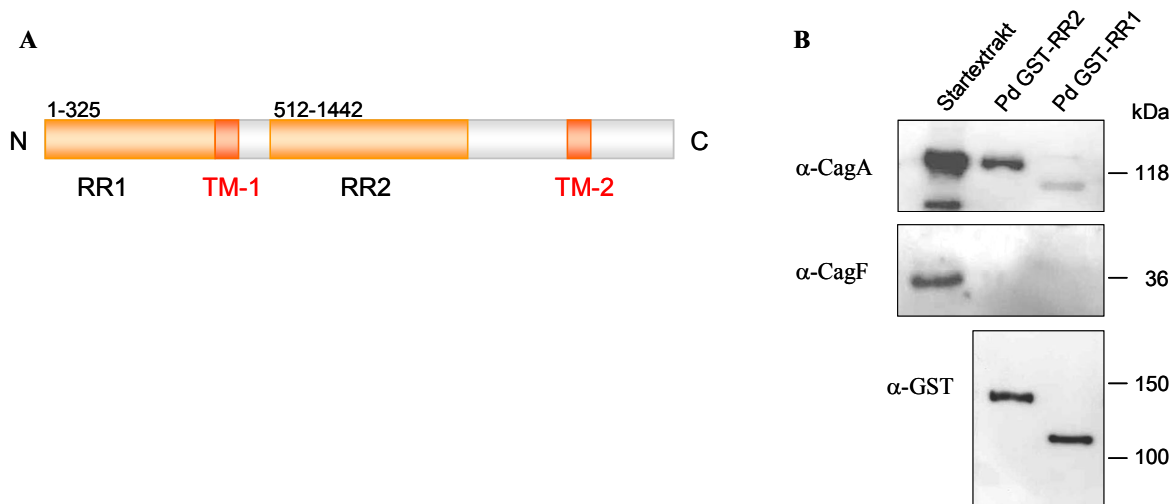


**Abb. 30: Keine Interaktion des Kopplungsproteins Cag $\beta$  mit CagF. Nachweis einer Interaktion mit CagA.** Der Startextrakt zeigt die Expression der Proteine CagA und CagF. Die Fraktionen nach dem *pull-down*-Assay mit GST-Cag $\beta$  und GST wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und die anschließenden Immunoblots mit Antiseren gegen CagA, CagF und GST inkubiert.

## 5.8 Test auf Interaktion mit dem Apparatsprotein CagY

Ein weiterer Ansatz, die gezeigte Lokalisation von CagF in räumlicher Nähe des Typ IV-Sekretionssystems auch biochemisch nachzuweisen, waren GST-*pull-down* Versuche mit einem Apparatsprotein. Es wurde das zu VirB10 homologe Protein CagY ausgewählt. CagY ist wahrscheinlich die kanalbildende Komponente des Cag-T4SS. Eine Anordnung um die Nadelstruktur auf der Bakterienoberfläche (190) könnte in den Interaktionsprozess mit der eukaryotischen Zelle involviert sein, obwohl noch kein Rezeptor gefunden werden konnte. Im Stamm 26695 ist das Protein durch zwei Sequenzwiederholungsbereiche gekennzeichnet, welche in Abb 31A schematisch dargestellt sind. Die *repeat region 1* (RR1, 317 AA), nahe dem N-Terminus ist wahrscheinlich im Cytoplasma lokalisiert, während die *repeat region 2* (RR2, 907 AA) in der Mitte des Moleküls, im Periplasma angeordnet ist (12,138).

Es wurden GST-Fusionen mit den beiden *repeat*-Regionen der putativen kanalbildenden Komponente des Sekretionsapparates CagY (RR1 und RR2) heterolog in *E. coli* exprimiert, aufgereinigt und für *pulldown*-Experimente in den *H. pylori* *wt*-Stämmen P12 und 26695 eingesetzt. Es konnte keine Interaktion mit CagF gezeigt werden. Auch *vice versa* durchgeführte Experimente, *pulldown*-Experimente mit GST-CagF und Nachweis einer Interaktion mit dem  $\alpha$ -CagY Antiserum, zeigten keine Präzipitation (nicht dargestellt). Allerdings konnte eine Interaktion des CagA-Proteins mit der RR2 des CagY nachgewiesen werden. Die Spezifität der Interaktion ergibt sich aus den negativen *pulldown*-Experimenten mit GST-CagY<sub>RR1</sub> und GST alleine.



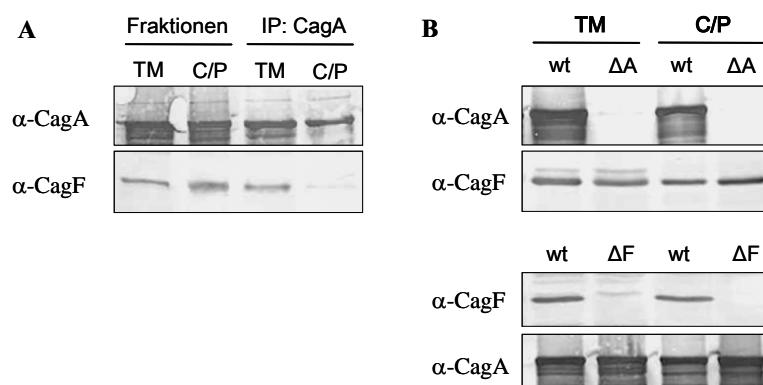
**Abb. 31 (A) Schematische Darstellung des Proteins CagY des Stammes 26695 (137).** Charakteristisch sind die *repeat*-Regionen im N-terminalen Bereich (RR1) und in der Mittelregion des Moleküls (RR2). Zwei Transmembrandomänen (TM) werden vorhergesagt, die eine Lokalisation des N-Terminus im Cytoplasma, einen das Periplasma durchspannenden mittleren Bereich sowie eine Lokalisation des finalen C-Terminus auf der Zelloberfläche wahrscheinlich machen. **(B) Interaktion des Apparatproteins CagY mit CagA und nicht mit CagF.** Die Startextrakte zeigen die Expression. Immunoblots gegen CagA, CagF und GST der Fraktionen nach dem *pulldown*-Assay mit GST-CagY<sub>RR1</sub>, GST-CagY<sub>RR2</sub> und GST.



## 5.9 Ort der Interaktion von CagA und CagF

Um einen Hinweis auf die mögliche Funktion von CagF zu bekommen, wurde der Frage nachgegangen, wo in der bakteriellen Zelle die Interaktion mit CagA stattfindet.

Zu diesem Zwecke wurden *H. pylori*-Zelllysate durch Ultrazentrifugation in eine Gesamtmembranfraktion (TM), welche sowohl die innere als auch die äußere Membran enthält, und eine lösliche Fraktion, bestehend aus Cytoplasma und Periplasma (C/P), aufgetrennt. Aus beiden Fraktionen wurde CagA immunopräzipitiert und eine Co-Präzipitation von CagF mittels Immunoblot gezeigt. Abb. 32A zeigt, dass in beiden Fraktionen CagA präzipitiert wurde, jedoch nur in der Gesamtmembranfraktion eine Interaktion mit CagF nachgewiesen werden konnte.



**Abb. 32: Die Interaktion von CagA und CagF findet an der cytoplasmatischen Membran statt.** (A) Fraktionierung von *H. pylori*-Zellen in eine Gesamtmembranfraktion (TM) und eine lösliche Fraktion (C/P). Immunopräzipitation von CagA aus beiden Fraktionen, Immunoblots mit Antiseren gegen CagA und CagF. (B) Vergleich der Membranpräparationen und der löslichen Fraktionen des *wt*-Stammes 26695 und der isogenen *cagA*- bzw. *cagF*-Mutante hinsichtlich Membranlokalisation der Proteine CagA und CagF.

Da deutlich gezeigt werden konnte, dass die untersuchte Interaktion an der Membran stattfindet, wurde nun überprüft, ob CagF für eine Membranrekrutierung von CagA notwendig sein könnte. Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurden *wt*-, *cagA*- und *cagF*-*H. pylori*-Zellen fraktioniert und diese Fraktionen auf Lokalisation von CagA und CagF überprüft.

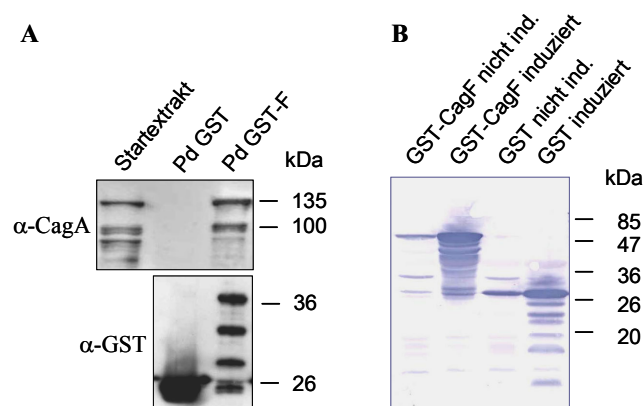
Die in Abb. 32B gezeigten Western Blots, angefärbt mit den Antiseren  $\alpha$ -CagA bzw.  $\alpha$ -CagF zeigen, dass CagF keinen Einfluss auf die Membranlokalisation von CagA zu haben scheint und umgekehrt. CagA liegt also in *wt* und *cagF*-Mutante ebenso wie auch CagF in *wt* und *cagA*-Mutante in unveränderten Mengen in der C/P- sowie in der TM-Fraktion vor. Beide Proteine wandern demnach unabhängig voneinander an die cytoplasmatische Membran. CagF hat keine Membranrekrutierungsfunktion für CagA.

## 5.10 Untersuchung der direkten Interaktion von CagA und CagF

In allen bisherigen Experimenten wurde die Interaktion von CagA und CagF vor dem Hintergrund eines *H. pylori*-Zelllysates gezeigt. Zum Nachweis einer direkten Interaktion, d. h. dass keine weiteren *H. pylori*-Proteine zur Vermittlung dieser Interaktion notwendig sind, sollte gezeigt werden, dass CagF auch in *E. coli* an das CagA-Protein bindet.

### 5.10.1 GST-pulldown Assay mit GST-CagF in *E. coli*

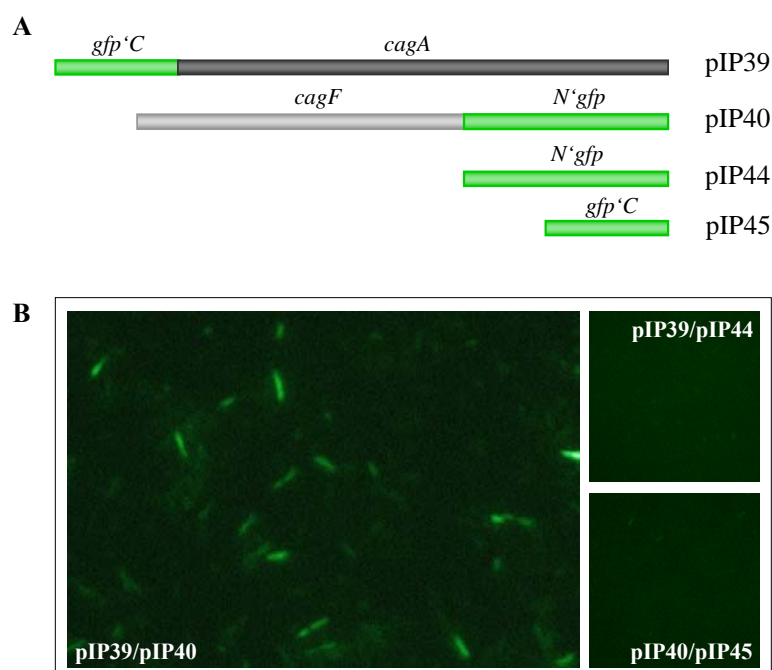
Für den GST-CagF *pulldown*-Assay in *E. coli* wurde ein CagA exprimierender *E. coli*-Stamm, DH5 $\alpha$  [pJP79] verwendet. Die Präzipitation wurde wie unter 2.4.9 beschrieben durchgeführt. CagA wurde mit GST-CagF, nicht aber mit GST alleine, präzipitiert (Abb. 33A). GST-CagF und GST wurden in gleichen Mengen in den Experimenten eingesetzt. Die Expression und Reinigung von GST-F und GST erfolgte wie unter 2.5.1 und 2.5.2 beschrieben. Abb. 33B zeigt Bakterienlysate vor und nach Induktion mit IPTG die über SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot mit  $\alpha$ -GST Antikörpern entwickelt wurden.



**Abb. 33: (A) Direkte Interaktion CagA und CagF.** GST-CagF- und GST-*pulldown* aus Lysaten eines CagA exprimierenden *E. coli*-Stammes. SDS-PAGE und Immunoblot mit Antikörpern gegen CagA und GST. CagA wurde mit GST-CagF, nicht mit GST, co-präzipitiert. **(B) Bakterienlysate vor und nach Induktion von GST-CagF bzw. GST mit IPTG,** die über SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot mit  $\alpha$ -GST Antikörpern entwickelt wurden.

### 5.10.2 BiFC (Bimolecular fluorescence complementation)-Assay in *E. coli*

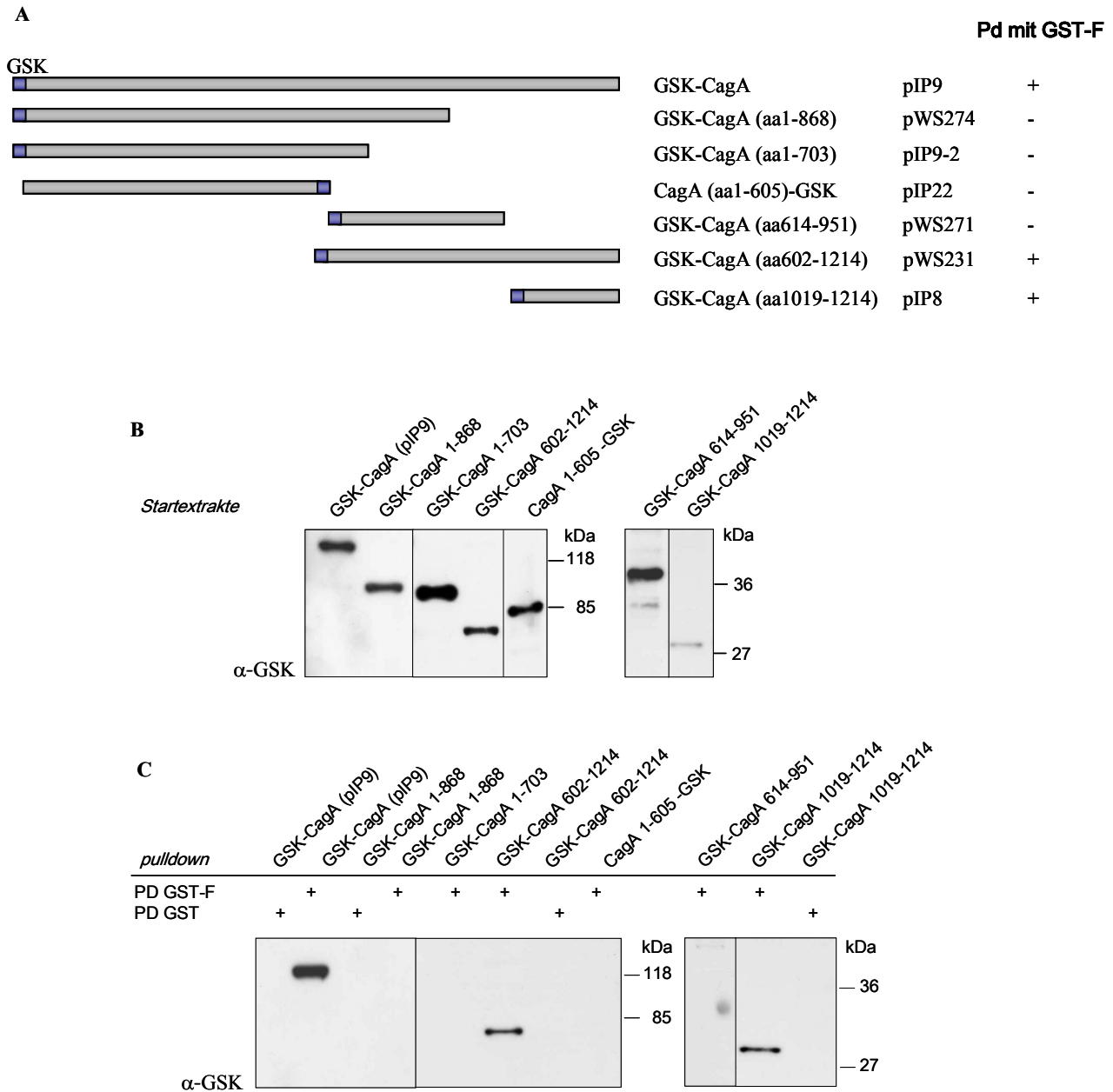
Dieser Fluoreszenz-basierte Assay kann zum Nachweis einer direkten Interaktion zwischen zwei Interaktionspartnern eingesetzt werden (13). Zu diesem Zwecke wurden die Codons 153-238 des *green fluorescent protein* an das 5'-Ende des *cagA*-Gens (pIP39) und die Codons 1-154 des *gfp*-Gens an das 3'-Ende von *cagF* (pIP40) fusioniert. Abb. 34A zeigt eine schematische Darstellung der Fusionsproteine. Beide Konstrukte wurden in *E. coli* coexprimiert und mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Als Kontrollen wurde das jeweilige Konstrukt zusammen mit dem komplementären *gfp*-Fragment exprimiert. Die mikroskopischen Aufnahmen in Abb. 34B zeigen deutlich, dass der *E. coli*-Stamm, welcher mit den Plasmiden pIP39 und pIP40 transformiert wurde, eine grüne Fluoreszenz aufweist. Die Kombinationen der Plasmide pIP39 und pIP44 sowie pIP40 und pIP45 zeigen keine Fluoreszenz, was darauf hindeutet, dass nur durch die Interaktion von CagF mit CagA die beiden GFP-Fragmente in ausreichende räumliche Nähe für eine Komplementation gebracht werden.



**Abb. 34: BiFC-Assay zum Nachweis einer direkten Interaktion CagA und CagF.** (A) CagA und CagF wurden an jeweils komplementäre Hälften des GFP-Proteins fusioniert. Als Kontrollen wurden diese Hälften alleine kloniert. (B) Eine Interaktion von CagA und CagF bringt die GFP-Fragmente in räumliche Nähe, diese komplementieren sich und es kommt zu grüner Fluoreszenz. Abgebildet sind die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen 24 h nach Co-Transformation.

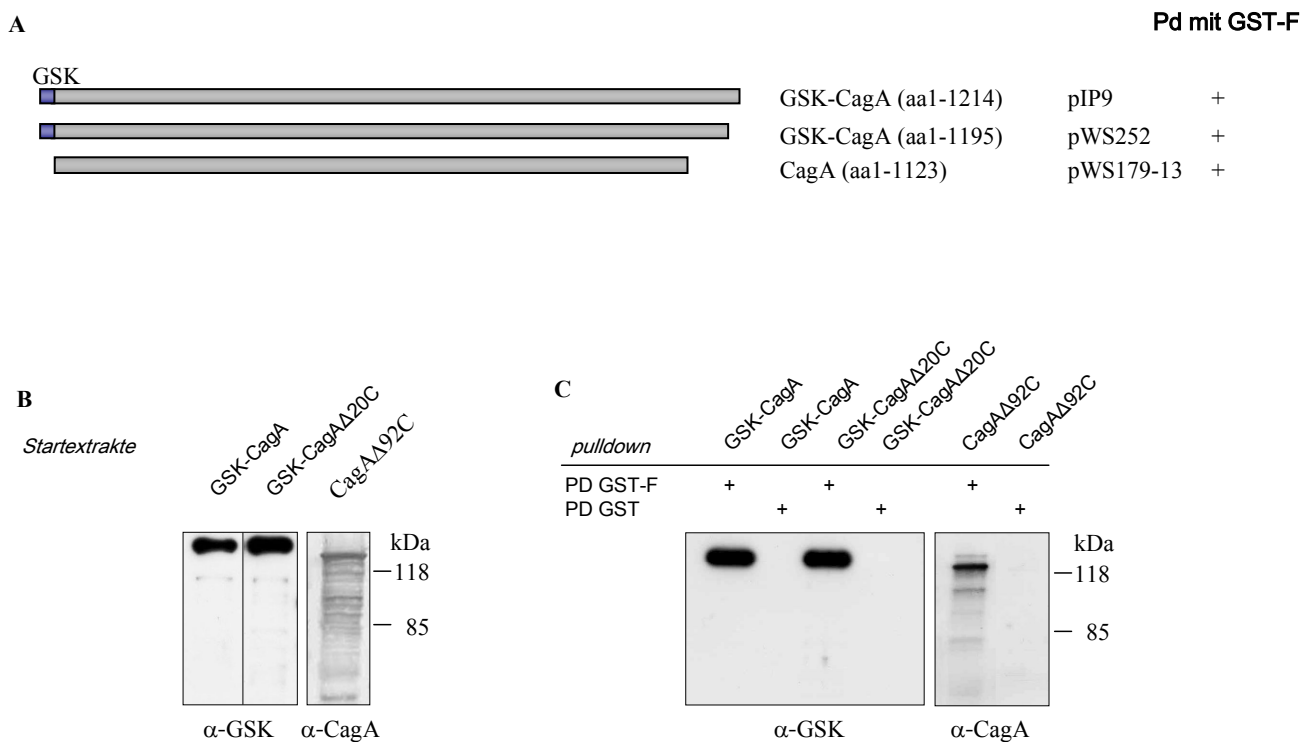
## 5.11 Charakterisierung der Chaperon-Binde-Domäne auf dem CagA-Protein

Die Bindedomäne von CagF auf dem CagA-Protein wurde mit Hilfe von GST-*pulldown* Experimenten genauer festgelegt. Dazu wurden Zelllysate verschiedener P12 $\Delta$ cagA-Stämme, komplementiert mit GSK-getaggttem CagA oder GSK-getaggtten verkürzten CagA-Varianten (Abb. 35), mit rekombinantem, an Glutathion-Sepharose gekoppeltem, GST-CagF-Fusionsprotein inkubiert. Mittels SDS-PAGE und Immunoblot wurde eine Interaktion überprüft. Immunoblots der *pulldown*-Fraktionen zeigen (Abb. 35), dass GST-CagF an GSK-getaggttes CagA bindet, nicht jedoch GST alleine. Alle CagA-Varianten, die die C-terminale CagA-Region enthalten, zeigten eine Interaktion mit GST-CagF, wohingegen CagA-Varianten, die nur N-terminale Bereiche des CagA-Proteins enthalten, nicht präzipitiert wurden. Vor allem die CagA-Variante ohne die 347 C-terminalen Aminosäuren (pWS274), welche einem häufig auftretenden Abbauprodukt von CagA (155,163,259) entspricht, zeigte keine Interaktion mit dem Chaperon, was deutlich macht, dass nur der C-Terminus des CagA-Moleküls für die Interaktion notwendig ist.



**Abb. 35: Eingrenzung der CBD auf dem CagA-Molekül.** (A) Schematische Darstellung der GSK-getaggtten CagA-Varianten, die für den GST-CagF *pull-down*-Assay eingesetzt wurden. (B) Startextrakte vor dem *pull-down*-Assay zeigen die Expression der CagA-Varianten. (C) Fraktionen nach dem *pull-down* mit GST-F bzw. GST als Kontrolle. Abgebildet sind Immunoblots gegen GSK.

Eine mögliche Erklärung wäre, dass CagF an der Erkennung des Sekretionssignals beteiligt ist, da im C-terminalen Bereich des CagA-Moleküls ein essentieller Teil des Translokationssignals liegt (siehe Abschnitt 2.1). Um dies zu überprüfen, wurden GST-CagF *pull-down*-Assays mit Stämmen durchgeführt, die ein GSK-getaggttes CagA $\Delta$ 20C exprimieren oder eine ungetaggte CagA-Variante, welcher 92 C-terminale Aminosäuren fehlen. Auch diese beiden CagA-Varianten interagieren mit GST-CagF, nicht jedoch mit GST alleine, im GST-CagF-*pull-down* Assay (Abb. 36).

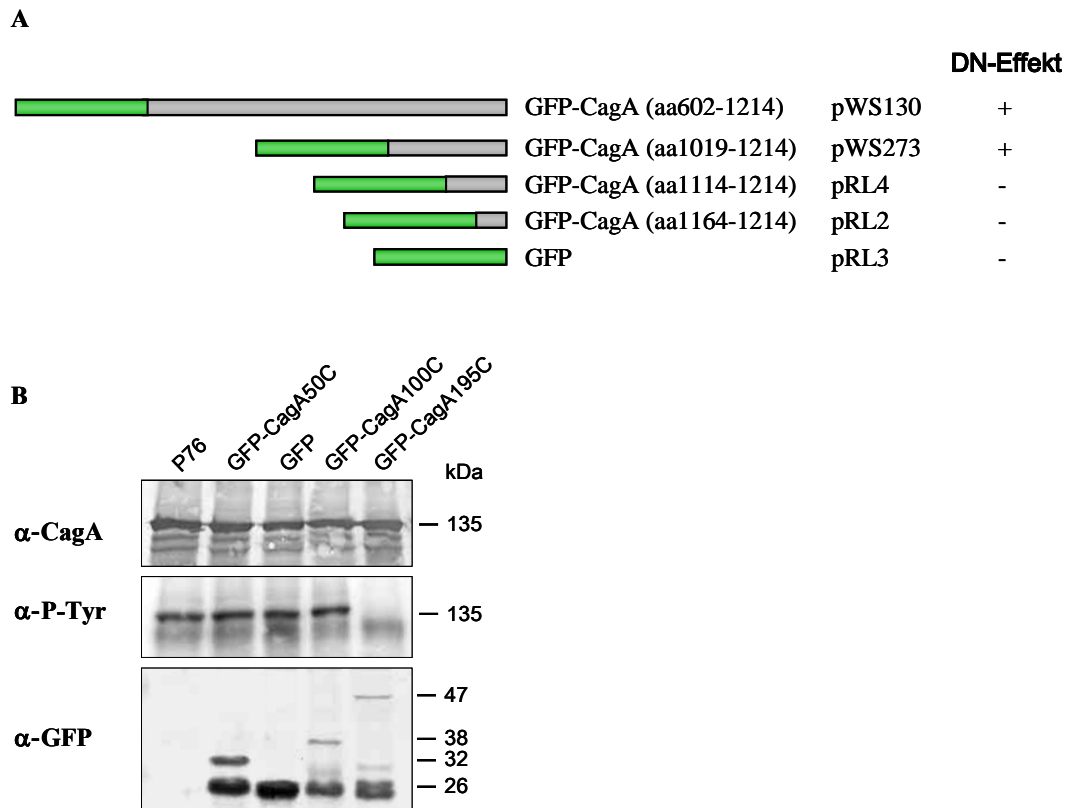


**Abb. 36: CagF ist nicht an der Signalerkennung beteiligt.** (A) Schematische Darstellung der verwendeten CagA-Varianten. (B) Startextrakte vor dem *pull-down*-Assay zeigen die Expression der CagA-Varianten. (C) Fraktionen nach dem *pull-down* mit GST-F bzw. GST als Kontrolle. Abgebildet sind Immunoblots gegen GSK bzw. CagA.

Zusammenfassend kann man die Chaperon-Binde-Domäne, bzw. den Bereich, der ausreichend ist für die Bindung von CagF an das CagA-Protein, auf die Aminosäurereste 1019 bis 1123 des P12 CagA-Moleküls festlegen.

## 5.12 Die Chaperon-Binde-Domäne ist notwendig für den dominant-negativen Effekt von GFP-CagA-Fusionen

Die Fusion der C-terminalen Hälfte des CagA-Proteins (pWS130) übt einen dominant negativen Effekt auf die Translokation des *wt* CagA-Proteins aus (118). Mit Hilfe definierter Fusionen sollte nun die für diesen Effekt hinreichende Region des CagA-C-Terminus näher bestimmt werden. Die entsprechenden Konstrukte (Abb. 37) wurden ausgehend vom Plasmid pWS130 (118), *gfpmut-2* fusioniert mit *cagA* (codons 614-1214) im Vektor pHel2, generiert. Um einen Effekt des nicht fusionierten GFP-Proteins auszuschließen, wurde mittels *Bgl*II/*Bam*HI-Restriktion das *cagA*-Gen entfernt (pRL3). Zur Herstellung der Plasmide pRL2 und pRL4, wurden die entsprechenden Fragmente mit Hilfe der Primerpaare WS316/JP67 und WS321/JP67 mittels PCR amplifiziert und über *Bgl*II- und *Kpn*I-Restriktionsschnittstellen in das Plasmid pWS130 ligiert. Die Konstruktion des Plasmides pWS273, welches zur Expression der 195 C-terminalen Aminosäuren des CagA-Proteins fusioniert an GFP dient, erfolgte auf alternativem Wege. Das Plasmid pIP9 wurde mit *Bgl*II/*Kpn*I geschnitten und das entstehende 585 bp lange DNA-Fragment wurde nach Agarosegelelektrophorese isoliert und über die entsprechenden Restriktionsschnittstellen in pWS130 ligiert. Alle Plasmide wurden über Konjugation in den *H. pylori*-Stamm P76 eingebracht und die Translokation des *wt* CagA-Proteins in Standardinfektionsexperimenten überprüft. Die Expression aller GFP-Fusionen ist in Abb. 37 dargestellt. GFP alleine hat keinen Einfluß auf die Translokation. Ebenso wenig konnte durch die Fusion von 50 oder 100 C-terminalen Aminosäuren an GFP ein dominant-negativer Effekt erzielt werden. Erst die 195 C-terminalen Aminosäuren des CagA-Proteins sind ausreichend, um das Fusionsprotein zum Sekretionsapparat hinzuführen und den Effekt auszuüben.



**Abb. 37: Genfusionen von *gfp* mit *cagA*.** (A) Schematische Darstellung der GFP-CagA-Fusionsproteine. (B) Expression der GFP-Fusionsproteine (WB unten) und der *wt* CagA-Moleküle (WB oben). Die Konstrukte pRL2, pRL3, pRL4 üben keinen dominant-negativen (DN) Effekt auf die CagA-Translokation aus (WB Mitte). Die Fusion von 195 Aminosäuren mit GFP (pWS273) bewirkte hingegen einen dominant-negativen Effekt auf die Translokation des *wt* CagA-Proteins. Dargestellt sind Lysate aus Infektionsexperimenten, die über SDS-PAGE aufgetrennt, auf PVDF-Membran geblottet mit den Antikörpern  $\alpha$ -CagA (AK257),  $\alpha$ -P-Tyr (PY99) und  $\alpha$ -GFP detektiert wurden.

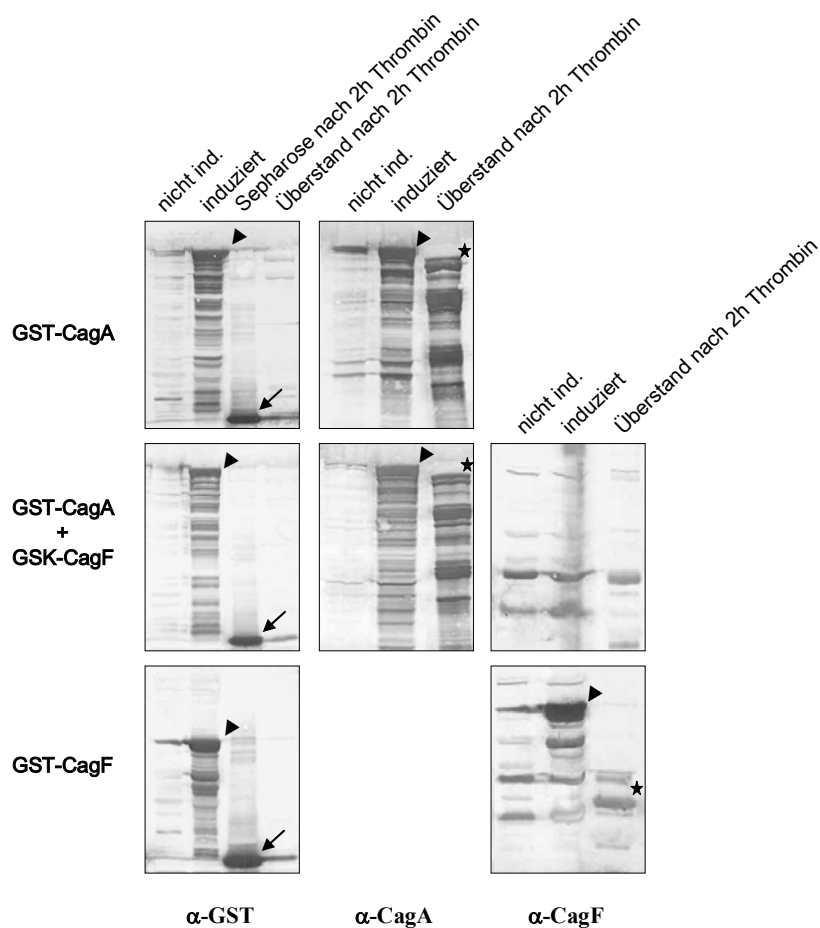
## 5.13 Funktionelle Charakterisierung der CagA-CagF-Interaktion

### 5.13.1 Expression und Reinigung der GST-Fusionsproteine

Zur heterologen Expression der Fusionsproteine GST-CagA (pRL1), GST-CagF (pWS226) sowie des Komplexes GST-CagA/GSK-CagF (pRL1/pIP32) wurde der *E. coli*-Stamm BL21(DE3) eingesetzt. Jeweils zwei transformierte Einzelklone wurden zunächst in einer Testinduktion im kleinen Maßstab (3 ml) nach Zugabe von IPTG auf Genexpression der gewünschten Konstrukte überprüft. Jeweils ein Transformand wurde zur Überexpression im größeren Maßstab (250 ml) eingesetzt.



Drei Stunden nach Induktion wurden die Kulturen geerntet, die Zellen lysiert und der proteinhaltige Überstand nach Zentrifugation über Affinitätschromatographie an Glutathion-Sepharose gebunden. Eine Abtrennung von der Säule erfolgte mittels Thrombinspaltung für 2 h. Dabei wurde das GST-Fragment von dem gereinigten Protein abgespalten und blieb an der Säule gebunden. Durch die direkte Abspaltung von GST auf der Matrix konnte sichergestellt werden, dass in der Elutionsfraktion kein GST-Fusionsprotein mehr enthalten ist, vielmehr ausschließlich Proteine ohne GST-Tag. Dadurch kann eine GST-Dimerisierung und eine daraus resultierende Bildung homodimerer Komplexe ausgeschlossen werden. Eine längere Inkubation mit der Protease ergab keine bessere Ausbeute. Die erhaltenen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf PVDF-Membranen übertragen und die Western Blots mit Antikörpern gegen CagA, CagF und GST angefärbt.



**Abb. 38: Immunoblots gegen CagA, CagF und GST der Fraktionen nach Expression und Affinitätschromatographie.** *E. coli*-Stämme BL21(DE3) [*gst-cagA*<sup>+</sup>], [*gst-cagF*<sup>+</sup>] oder [*gst-cagA*<sup>+</sup>*gsk-cagF*<sup>+</sup>] vor und nach Induktion mit 200  $\mu$ M IPTG sowie nach Thrombinabspaltung von der Glutathion-Sepharose Matrix nach 2 h. GST-Fusionsproteine (Pfeilspitzen), Proteine nach Thrombinspaltung (Stern), der GST-Rest (Pfeil) blieb an der Säule gebunden.

### 5.13.2 Analytische Gelfiltration

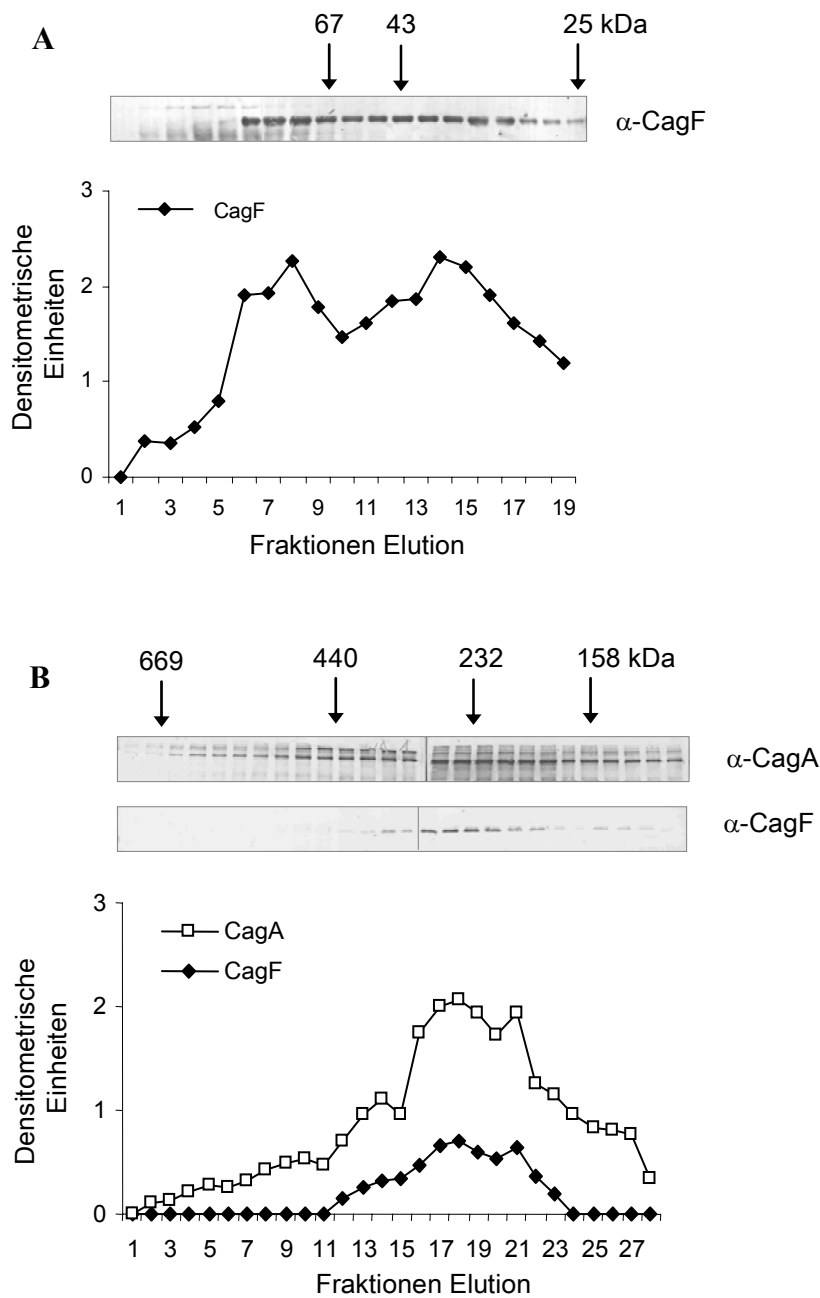
Sekretions-Chaperone in T3SS bilden typischerweise Homodimere und interagieren mit ihrem Effektorprotein ebenfalls als Dimer. In T4SS sind bislang kaum Chaperon-ähnliche Moleküle beschrieben worden. So konnte bisher nur gezeigt werden, dass im *Agrobacterium* VirB-System zwei Moleküle VirE1 an zwei Bindedomänen im Molekül des Effektors VirE2 assoziieren (241). Ohne Substrat bildet das Chaperon VirE1 homodimere bis homomultimere Komplexe (265). In diesem Zusammenhang war es nun äußerst interessant, die Stöchiometrie des CagA/CagF-Komplexes mit Hilfe von analytischer Gelfiltration näher zu charakterisieren.

Die Proteine CagA und CagF wurden als GST-Fusionen jeweils einzeln als auch in der Kombination GST-CagA und GST-CagF coexprimiert und gereinigt. Die Gelpermeationschromatographie wurde an einer SMART-Anlage (Amersham Biosciences) durchgeführt. Die Auftrennung der gereinigten und ultrazentrifugierten Proteingemische nach ihrer Größe erfolgte über die Gelfiltrationssäulen Superdex<sup>®</sup> R 75 PC 3.2/30 (CagF) und Superdex<sup>®</sup> 200 PC 3.2/30 (CagA und CagA/CagF). Dabei wurden ab dem Ausschlußvolumen der Säulen (0,8 ml) 25 µl Fraktionen gesammelt und später über SDS-PAGE aufgetrennt und mittels  $\alpha$ -CagA bzw.  $\alpha$ -CagF Immunoblot analysiert. Die Fraktionen der Eichproteine sind in den Abbildungen 39A und 39B entsprechend gekennzeichnet. Eine densitometrische Auswertung wurde mit der Software Quantity One 4.4.0 von BioRad durchgeführt.

Dadurch konnte gezeigt werden, dass CagF Homodimere bildet. Sowohl im Chromatogramm als auch in der abgebildeten densitometrischen Darstellung (Abb. 39) wird deutlich, dass CagF im Bereich von 36 kDa und auch von 72 kDa eluiert. Diese beiden Peaks entsprechen der monomeren und der dimeren Form von CagF.

Die Gelfiltration des Komplexes CagA/CagF zeigt anhand des Elutionsmusters in Abb. 39, dass CagA in multimeren Komplexen vorliegt, die von einem Molekulargewicht von 135 kDa bis zu über 600 kDa reichen. Die Fraktionen, in denen der größte Teil des aufgereinigten CagA-Proteins vorliegt, befinden sich jedoch im Bereich von etwa 200 bis 250 Kilodalton. In diesen Fraktionen eluiert auch CagF, was auf eine Stöchiometrie von 1 x CagA und 2-3 x CagF schließen lässt, wenn von einer globulären Proteinstruktur ausgegangen wird. In Anbetracht der Tatsache, dass CagF alleine eindeutig als Dimer vorliegt, ist eine 1:2 Stöchiometrie sehr wahrscheinlich.

Zusätzlich wurde CagA ohne CagF aufgereinigt, um zu überprüfen, ob die CagF-Bindung die Assoziation von CagA in multimeren Komplexen beeinflusst. Auch hier konnte gezeigt werden, dass CagA in großen, mehrere hundert kDa umfassenden Komplexen vorliegt. CagF scheint hierauf keinen Einfluss zu haben. Allerdings wurde deutlich, dass CagA in Abwesenheit seines Sekretions-Chaperons CagF stärker prozessiert wird. In den Fraktionen nach der Gelfiltration konnte reproduzierbar nur noch ein Bruchteil des aufgetragenen CagA-Proteins nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 39: Analytische Gelfiltration von gereinigtem CagF und dem Komplex CagA/CagF.** (A) Fraktionen des gereinigten CagF-Proteins nach Superdex 75 Gelfiltrationssäule. Immunoblots gegen CagF und anschließende densitometrische Auswertung. (B) Reinigung des Komplexes GST-CagA und GSK-CagF über Affinitätschromatographie und Thrombinspaltung. Die Fraktionen nach Superdex 200 Gelfiltration wurden mittels Immunoblots gegen CagA und CagF und Densitometrie ausgewertet. Durch Pfeile sind die Elutionsvolumina und die Molekulargewichte der Markerproteine angezeigt.

## IV Diskussion

Die Translokation von CagA hat eine Reihe von Veränderungen in der Wirtszelle zur Folge. So kommt es zur Inaktivierung von Kinasen der Src-Familie begleitet von Proteindephosphorylierungen (163,211), und die Integrität der epithelialen *tight-junctions* wird gestört (9,19). Zusätzlich können *in vitro* massive Veränderungen des Aktincytoskeletts, der so genannte *hummingbird*-Phänotyp, sowie erhöhte Zellmotilität (*scattering*-Phänotyp) beobachtet werden (54,112,113,153,208,230). Wirtszellen reagieren auf die Injektion von CagA durch veränderte Signaltransduktion sowie modifizierte Genexpression (79,88,103,238,264). Daraus erschließt sich, dass eine CagA-Translokation entscheidende Konsequenzen für die Bakterium-Wirts-Interaktion hat und daher wahrscheinlich einer strikten Kontrolle unterliegt. Der spezifische Mechanismus mit dem CagA in die Wirtszellen transloziert wird ist weitgehend unbekannt.

### 1 Etablierung eines Translokationsassays

Zahlreiche pathogene Mikroorganismen nutzen Typ III- oder Typ IV-Sekretionssysteme (T3SS bzw. T4SS), um Virulenz-assoziierte Proteine in eukaryotische Zellen zu injizieren. Diese modulieren oder zerstören verschiedenste zelluläre Funktionen, wie z. B. Signaltransduktionskaskaden oder den Vesikeltransport. In diesem Zusammenhang wurden verschiedene Reportersysteme entwickelt, um eine Translokation nachzuweisen (37,47,68,221,240). Die eingesetzten Methoden basieren in der Regel auf Genfusionen, die Hybridproteine aus Effektorproteinen (bzw. Teilen davon) und einer Reporterdomäne codieren.

Diese Reporterdomäne wird erst in der Wirtszelle entweder modifiziert oder aktiviert oder interagiert dort mit einem Substratmolekül.

Der erste Translokations-Assay, der für Typ III-Sekretionssysteme eingesetzt wurde, war die ca. 400 Aminosäuren umfassende, katalytische Domäne des Calmodulin-abhängigen Adenylat-Cyclase-Toxins CyaA von *Bordetella pertussis* (221). Injizierte CyaA-Hybride werden durch Calmodulin aktiviert und führen zu einem Anstieg von intrazellulärem, cyclischem AMP, welches mittels ELISA direkt nachgewiesen werden kann. Dieses System ist umfassend zum Nachweis translozierter Substrate in T3SS (35,129,199) und T4SS (48,156) eingesetzt worden. Limitierend ist hier die Tatsache, dass einige pathogene Bakterien über Toxine verfügen, die als Adenylat-Cyclasen wirken, und so zu einem Anstieg des zellulären cAMP-Spiegels über den physiologischen Level führen. Dadurch ist ein cAMP-Anstieg durch das CyaA-Fusionsprotein nicht mehr messbar, wie z. B. für das Toxin ExoY in *Pseudomonas aeruginosa* beschrieben wurde (260). In Infektionsversuchen mit *H. pylori* hingegen konnte das Gegenteil beobachtet werden. *H. pylori* hat eine starke inhibitorische Wirkung auf die Bildung von intrazellulärem cAMP, so dass sogar eine Stimulation durch Histamin verhindert wird (98,231). Demzufolge erscheint der CyaA-Assay eher ungeeignet, um Proteintranslokation in *H. pylori* nachzuweisen. Ein weiteres Reportersystem für Typ III- und Typ IV-Sekretionssysteme basiert auf Fusionen mit der Cre-Rekombinase. Die Cre-Rekombinase katalysiert die Rekombination von DNA-Segmenten, die von *lox*-Sequenzen (*locus of crossing over*) (34 bp) flankiert werden, was den Verlust oder die Inversion dieses Bereichs zur Folge hat. Damit wird in der Wirtszelle eine dauerhafte Veränderung erzeugt, die unabhängig von der Stabilität der Effektorproteine nachgewiesen werden kann. Fusionen mit der Cre-Rekombinase konnten in *H. pylori* jedoch nicht erfolgreich transformiert und exprimiert werden. Dies ist vermutlich auf einen toxischen Effekt der Cre-Rekombinase auf *H. pylori*-Zellen zurückzuführen, da nach Einführung eines *frame shifts* in das *cre*-Gen eine Transformation von *H. pylori* möglich war. Weiterhin haben sich TEM-1  $\beta$ -Laktamase-Hybride als geeignet erwiesen, um die Injektion von Effektorproteinen nachzuweisen (47,266).

Die Spaltung des fluoreszierenden  $\beta$ -Laktamase-Substrates CCF2/AM durch die TEM-1  $\beta$ -Laktamase-Domäne des translozierten Hybridproteins unterbindet den CCF2/AM *fluorescence resonance energy transfer* (FRET). Dies führt zu einer veränderten Lichtemission von grün (520 nm) nach blau (450 nm) und ermöglicht damit eine einfache, fluoreszenzbasierte Auswertung (vgl. auch Ergebnisse, Abb. 6). Marketon *et al.* (145) nutzten dieses System, um im Mausmodell nach Infektion mit *Y. pestis* diejenigen Zellpopulationen zu identifizieren, in die Yop-TEM-1 Hybridproteine injiziert worden waren. Auch in der Charakterisierung von Typ III-Effektorproteinen in enteropathogenen und enterohämorrhagischen *E. coli*-Stämmen erwies sich dieser Assay als erfolgreich (47). In *H. pylori* konnten *blaM*-Fusionen des gesamten *cagA*-Gens sowie des für die C-terminale Hälfte codierenden Genabschnittes erfolgreich als TEM-1-Fusion exprimiert werden. Das Hybridprotein TEM-1-CagA wurde jedoch nicht transloziert. Zusätzlich konnte bei Expression in zwei Wildtyp-Stämmen ein dominant-negativer Effekt auf die Translokation des CagA-Proteins reproduzierbar gezeigt werden. Die Fusion der C-terminalen Hälfte des CagA-Moleküls mit dem *green fluorescent protein* (GFP), übt ebenfalls einen dominant-negativen Effekt auf die Translokation von CagA aus (118). Dieser Effekt lässt sich vermutlich auf die rigide  $\beta$ -barrel-Struktur des GFP-Proteins (168,263) zurückführen, die den Kanal zu blockieren scheint. Möglicherweise behindern Struktur, Ladungen (224) und / oder Größe (29 kDa) der TEM-1  $\beta$ -Laktamase ebenfalls den Transport über das Cag-T4SS.

Im Gegensatz dazu ist der GSK-Tag mit 13 Aminosäuren sehr klein und wohl vor allem aufgrund dessen sehr gut als Reportersystem im Cag-T4SS einsetzbar. Die geringe Größe minimiert den Einfluss des Tags auf die Sekretion und die Funktion des Effektorproteins in der Wirtszelle. In *Yersinia* wurde gezeigt, dass die Fusion des 35 Aminosäuren langen ELK-Tags (68), welcher nach Translokation im Zellkern phosphoryliert wird, an das YopN-Protein dazu führt, dass YopN nicht mehr funktionell ist. Eine Fusion des GSK-Tags hingegen hatte keinen Einfluss auf die Proteinfunktion. Ebenso wurde bei den Effektorproteinen YopH-GSK und YopJ-GSK gezeigt, dass diese unverändert an der Wirtszellmodulation mitwirken (91).

Kommerziell erhältliche Antikörper (Cell Signaling Technology) ermöglichen den Nachweis des getaggten Proteins unabhängig von einer Phosphorylierung (anti-GSK Antikörper) bzw. ausschließlich nach einer Translokation und Phosphorylierung (phosphospezifischer anti-GSK Antikörper). Durch dieses System kann zum einen die Gesamtmenge des während einer Infektion exprimierten Fusionsproteins, zum anderen, unabhängig davon, spezifisch nur das translozierte Protein nachgewiesen werden. Den beschriebenen Ergebnissen in *Yersinia* entsprechend, wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass eine N-terminale GSK-Fusion nicht mit der CagA-Funktion interferiert. Die Translokation findet unverändert statt und CagA wird in AGS-Zellen tyrosinphosphoryliert. Weiterhin war GSK-CagA unvermindert in der Lage, die charakteristischen Veränderungen des Aktincytoskeletts, den *hummingbird*-Phänotyp, zu induzieren (Daten nicht gezeigt). Ebenso konnte die im Stamm P12 $\Delta$ cagA im Vergleich mit dem Wildtyp-Stamm P12 auf 60 % reduzierte IL-8 Induktion in AGS-Zellen durch GSK-CagA komplementiert werden. Der GSK-Tag wird nach Injektion in eukaryotische Zellen phosphoryliert, aber nicht innerhalb bakterieller Zellen. Die Identität der verantwortlichen eukaryotischen Proteinkinase(n) ist noch nicht bekannt. Serin 9 der Glykogen-Synthase-Kinase 3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) wird bekannterweise durch die Protein Kinase B (PKB) phosphoryliert (89,176). Inhibitoren wie LY294002 oder Wortmannin, die die Aktivierung von PKB blockieren, zeigen jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die GSK-Tag-Phosphorylierung (91). Auch Versuche, die PKB-Aktivität durch Zugabe der Phosphataseinhibitoren Natriumvanadat oder Okadasäure (*ocadaic acid*) (11) zu erhöhen, resultierten zwar in einer Zunahme der phosphorylierten endogenen GSK-3 $\beta$ , nicht jedoch in erhöhter Phosphorylierung des GSK-Tags (Daten nicht gezeigt). Dies ist nicht weiter ungewöhnlich, da Erkennungsmotive für Proteinkinasen, die aus dem natürlichen Kontext entfernt werden, oft unspezifisch von alternativen Kinasen erkannt und phosphoryliert werden (222). Daher scheint die Phosphorylierung des GSK-Tags nicht strikt durch zelluläre Bedingungen reguliert zu sein. Dies und die Phosphorylierung des GSK-Tags in vielen verschiedenen Zelltypen ermöglicht einen universellen Einsatz des Systems zum Nachweis Typ III- und Typ IV-translozierter Proteine. So konnte im Zusammenhang mit dem Ysc-T3SS in *Yersinia* eine GSK-Phosphorylierung in HeLa-Zellen (91) und in AGS-Zellen (siehe Seite 60, Abschnitt III.1.2) gezeigt werden. Die durch das



Cag-T4SS vermittelte Translokation und die GSK-Phosphorylierung von GSK-CagA in den Epithelzelllinien AGS, ST3051 und den Makrophagenzelllinien J774A.1 und THP-1 zeigt ein breites Anwendungsspektrum in humanen (HeLa, AGS, ST3051, THP-1) und auch murinen (J774A.1) Zelllinien. Eine fehlende GSK-Phosphorylierung von GSK-CagA in HeLa-Zellen ist wahrscheinlich auf eine fehlende, oder unter der Nachweisgrenze liegende, CagA-Translokation des Stammes P12 in HeLa-Zellen zurückzuführen (22). Ein Vergleich der CagA-Translokation verschiedener *H. pylori*-Stämme in verschiedene Zelllinien zeigt, dass sowohl bisher unbekannte Faktoren auf bakterieller Seite, sowie wirtszellspezifische Determinanten eine Rolle spielen (18,22,87,211). Hierbei mögen Rezeptoren auf der Zelloberfläche entscheidend sein oder es könnte eine Aktivierung des T4SS durch zelluläre Faktoren stattfinden.

## 2 Definition verschiedener CagA-Signalbereiche

### 2.1 Translokationssignal

Eine grundlegende Frage ist, wie aus einem zellulären Proteinpool das richtige Protein für die Translokation erkannt und dem korrekten Sekretionssystem zugeführt wird. In *Salmonella typhimurium* wurde gezeigt, dass die Entscheidung, ob die Sekretion über das Flagellensystem oder das phylogenetisch verwandte T3SS SPI-1 abläuft, stark reguliert ist. Die Translokation von SopE über SPI-1 benötigt ein N-terminales Sekretionssignal sowie eine Bindedomäne (CBD) für das Sekretions-Chaperon InvB. In Abwesenheit von InvB wird der Transport unterbunden. Fehlt jedoch die CBD, kommt es zur Sekretion von SopE über das Flagellensystem und auch das SPI-1-Sekretionssystem (78). Das Protein wird prinzipiell also von beiden Systemen als Substrat erkannt, die Spezifität wird jedoch durch molekulare Mechanismen (hier: Chaperonbindung) garantiert und somit eine unerwünschte Sekretion über das Flagellensystem verhindert. Alleine in *H. pylori* sind bisher mindestens vier T4SS bekannt, die durch mehr oder weniger starke Homologien zu bekannten Systemen entdeckt worden sind (15,117,171). Funktionell sind jedoch erst zwei davon näher untersucht worden: Das Cag-System und das für die Aufnahme von DNA verantwortliche ComB-System.

Trotz der engen Verwandtschaft aufgrund eines gemeinsamen „Vorfahren“ werden die entsprechenden Substrate exakt dem korrekten System zugeordnet. Ein tieferes Verständnis der involvierten Signale und Mechanismen fehlt jedoch weitgehend.

Bisher veröffentlichte Daten zeigen, dass bei der großen Diversität der T4-transportierten Substrate ebenfalls komplett unterschiedliche Substraterkennungsmechanismen zum Einsatz kommen (45). Einige Effektormoleküle enthalten Sec-abhängige N-terminale Signalsequenzen. Dies deutet darauf hin, dass diese Substrate, z. B. das Pertussistoxin in *B. pertussis* (40) oder das DotA-Protein in *L. pneumophila* (157), wahrscheinlich Sec-abhängig in das Periplasma transportiert werden, um anschließend von dort über das T4SS sekretiert zu werden. Diese Art von Signalsequenz fehlt dem CagA-Protein.

Bei Fusionen der N- sowie der C-terminalen Hälfte des CagA-Moleküls mit dem *green fluorescent protein*, übt die C-terminale, nicht aber die N-terminale Fusion einen dominant-negativen Effekt auf die Translokation von *wt* CagA aus (118). Diese Beobachtung war der erste Hinweis auf eine Signalsequenz im C-Terminus des CagA-Proteins. Die anschließende Analyse von C-terminalen CagA-Deletionsvarianten zeigte, dass eine Deletion von 12 Aminosäuren zum Verlust der Translokationsfähigkeit führt. Das Fehlen von 5 Aminosäuren hat noch keinen gravierenden Einfluss auf die CagA-Translokation, während bei definierter Deletion von 7 Aminosäuren die Effizienz des Transports stark verringert ist. CagA zeichnet sich also durch ein C-terminal lokalisiertes Sekretionssignal aus. Aus den Daten geht weiterhin hervor, dass die beiden Lysinreste, bzw. deren Ladung, an den Positionen -5 und -7 wahrscheinlich die Stärke der Interaktion mit dem Signalerkennungsprotein beeinflussen, da deutlich eine zunehmende Verringerung der Translokationseffizienz zu beobachten ist, wenn CagA C-terminal verkürzt wird. Durch definierte Mutagenese der positiv geladenen Aminosäuren an den Positionen -7 und -12 des CagA-Proteins konnte gezeigt werden, dass diese Ladungen für den Transport nicht essentiell sind (118).

Einige C-terminale Sekretionssignale verschiedener Typ IV-Sekretionssysteme sind kürzlich näher charakterisiert worden. Die C-terminalen Aminosäurebereiche einiger Typ IV-sekretierter Proteine sind in Abb. 40 dargestellt. In *Agrobacterium tumefaciens* konnte anhand von Proteinfusionen mit der Cre-Rekombinase gezeigt werden, dass die Effektorproteine VirD2, VirD5, VirE2, VirE3 und VirF im C-terminalen Molekülbereich die für die Sekretion notwendigen Informationen enthalten. Die Deletion von nur einer Aminosäure am C-Terminus von VirF führte zu einer drastischen Verringerung der Translokationseffizienz auf 4 % (242). Hier scheint die letzte Aminosäure, oder auch die Position anderer Aminosäurereste vom C-Terminus aus ausschlaggebend zu sein. Zusätzlich sollen auch positiv geladene Argininreste eine Rolle spielen (202,240-242). Die kleinste translozierbare Einheit des VirF-Proteins besteht aus nur 19 C-terminalen Aminosäuren, die ausreichend waren um als Cre-Fusion transloziert zu werden, allerdings mit um 75 % verminderter Effizienz. Im Cag-T4SS würde eine solche Verringerung der Translokationseffizienz unter der Nachweisgrenze einer CagA-Translokation liegen, unabhängig davon, ob der GSK-Phosphorylierungs- oder Tyrosinphosphorylierungsassay eingesetzt wird. Zusammenfassend wird für das *A. tumefaciens* VirB/D4-System ein C-terminales Sekretionssignal postuliert, das einen hydrophilen Charakter aufweist, eine positive Nettoladung und ein Konsensusmotiv RX7RXXRX.

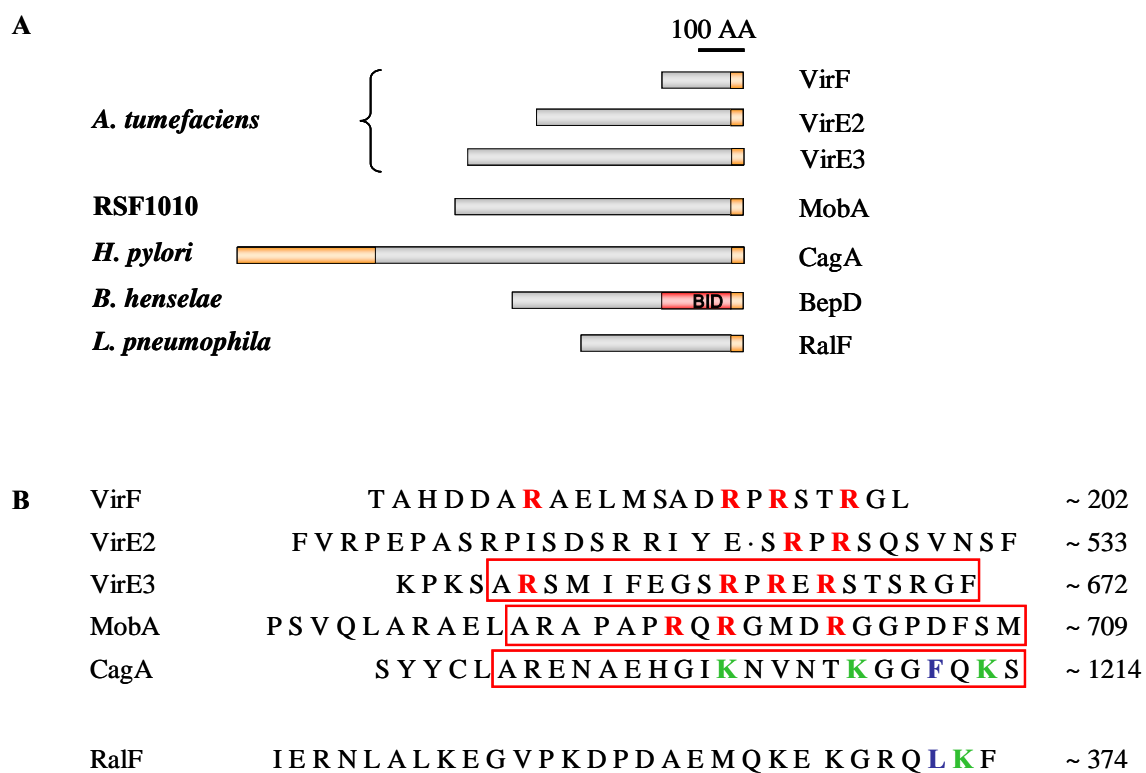
Die Bep-Effektorproteine des VirB-Systems in *Bartonella henselae* zeichnen sich ebenfalls durch ein C-terminal lokalisiertes, positiv geladenes Sekretionssignal aus (206). Diese Signalregion ist allerdings nicht ausreichend, um den Transport zu vermitteln. Zusätzlich wird ein stromaufwärts liegender 140 Aminosäuren umfassender Molekülbereich, die so genannte BID (*bep intracellular delivery*) –Domäne, benötigt. Eine ähnliche Domäne kommt in einigen konjugativen Relaxasen vor, fehlt jedoch im CagA-Protein (Daten nicht gezeigt).

In *Legionella pneumophila* erfordert der Transport von RalF über das Dot/Icm-System einen hydrophoben Aminosäurerest an Position -3. Eine Deletion von mehr als 2 C-terminalen Aminosäuren wird hier nicht toleriert. Positiv geladene Reste im C-Terminus spielen jedoch keine Rolle. Ähnlich dem VirF-Protein, sind die 15 C-terminalen Aminosäuren des RalF-Moleküls ausreichend, um Reporterproteininfusionen in die Zielzelle zu sekretieren (156). Hydrophobe Aminosäuren sind bei CagA wahrscheinlich nicht essentiell, da die Deletion von 5 C-terminalen Aminosäuren, einschließlich des Phenylalanins an Position -4, toleriert wird. Hydrophobizität scheint kein generelles Motiv Typ IV-sekretierter Proteine zu sein, wie durch den Sequenzvergleich in Abb. 40 deutlich wird.

Interessanterweise sind C-terminale Signaltbereiche zumindest teilweise austauschbar. So konnten die C-terminalen 20 Aminosäuren des CagA-Proteins durch die entsprechenden Regionen des MobA-Proteins und des Proteins VirE3 funktionell ersetzt werden (118). Dies deutet darauf hin, dass die Substraterkennung einiger oder aller T4SS zumindest teilweise Gemeinsamkeiten aufweist. Der umgekehrte Versuch, ein Hybridprotein aus MobA $\Delta$ 20C und CagA20C über das Cag-T4SS zu sekretieren, gelang nicht, da das GSK-MobA-CagA20C und auch GSK-MobA in *H. pylori* zwar exprimiert, aber fast vollständig degradiert wurde (Daten nicht gezeigt). Interessanterweise gelingt es in einigen T4SS vollständige Substrate eines anderen Organismus zu translozieren. So konnte gezeigt werden, dass die beiden Effektorproteine Msi059 und Msi061 aus *Mesorhizobium loti* vom VirB/D4-System in *A. tumefaciens* erkannt und transloziert werden (121). Dies liegt vermutlich in der engen phylogenetischen Verwandtschaft der beiden Spezies begründet, da z. B. die Translokation des RalF-Proteins in *A. tumefaciens* nicht funktioniert (242).

Die Kristallstruktur des translozierten Proteins RalF in *Legionella pneumophila* zeigt, dass die C-terminalen 20 Aminosäuren des Proteins eine ungeordnete Struktur aufweisen (10). Auch die C-Termini aller VirB/D4-translozierten Proteine zeigen laut Sekundärstrukturvorhersagen eine ungeordnete Struktur (242). Strukturanalysen für ungeordnete Proteinbereiche mit DISpro (50) sagen ebenfalls für das CagA-Protein eine ungeordnete Struktur für die 12 C-terminalen Aminosäuren voraus. Dieses physikalische Charakteristikum könnte entscheidend sein für die Substraterkennung und ein weit verbreitetes Merkmal C-terminaler Signale in T4SS darstellen.

Jedenfalls scheint die Erkennung und der Transport von Substraten, die über die äußere Membran oder über beide bakteriellen Membranen transportiert werden, Signale zu benötigen, welche nicht ohne weiteres aus der Primärsequenz abgeleitet werden können. C-terminale Signalsequenzen scheinen in T4SS jedoch weit verbreitet zu sein und einige allgemeingültige Merkmale aufzuweisen. Zusätzliche Charakteristika determinieren jedoch die Spezifität für das entsprechende T4SS. Im Dot/Icm-System gibt es sowohl Substrate mit N-terminaler (DotA) als auch mit C-terminaler Signalsequenz (RalF). Sec-abhängige und C-terminale Signalsequenzen könnten also durchaus alternative Wege sein, um Zugang zum periplasmatischen Raum und anschließend zum T4SS zu erlangen.



**Abb. 40: Sekretionssignale verschiedener Typ IV-sekretierter Proteine.** (A) Proteinsubstrate (grau) und ihre C-terminalen Sekretionssignale (orange) einiger pathogener Mikroorganismen. (B) C-terminale Aminosäuren einiger Typ IV-Effektorproteine. Positive Ladungen sind entscheidend im VirB-System in *A. tumefaciens* (rot). Die Relaxase MobA wird von *A. tumefaciens* und *L. pneumophila* transloziert und die 20 C-terminalen Aminosäuren vermitteln, fusioniert an CagA, den Transport in *H. pylori*. Im Cag-T4SS funktionelle Signalsequenzen sind rot umrahmt. Die positiven Ladungen in RalF und CagA sind nicht essentiell für die Translokation des Proteins (grün). Hydrophobe Aminosäuren (blau) sind essentiell für die Translokation von RalF, nicht notwendig für CagA (nach (44)).

Mit der Zielsetzung, das minimal translozierbare CagA-Fragment zu definieren, wurden verschiedene CagA-Varianten mit N-terminalen Deletionen generiert. Überraschenderweise wurde keines dieser GSK-getaggten Konstrukte nach Infektion von AGS-Zellen phosphoryliert. Sogar die Deletion von nur 39 Aminosäuren am N-Terminus des CagA-Proteins verhinderte die Translokation des Proteins. *In vitro* konnte bei allen Varianten eine Phosphorylierung nachgewiesen werden, was darauf hindeutet, dass hier tatsächlich die Translokationsfähigkeit beeinträchtigt ist. Eine Zusammenfassung ist im Anhang (Abb. 44) dargestellt. Diese Daten zeigen, dass die N-terminalen Bereiche des CagA-Proteins für die Translokation wichtig sind, zusätzlich zur konservierten C-terminalen Signalregion. CagA ist bislang das erste Typ IV-Effektorprotein, das neben dem in T4SS vorkommenden C-terminalen Translokationssignal zusätzlich den N-terminalen Proteinbereich zur Sekretion benötigt.

Um zu überprüfen, ob nur ein kurzer N-terminaler Bereich notwendig ist, wurde eine GSK-CagA-Variante mit Deletion der Aminosäuren 58-587 konstruiert. Dieses CagA-Protein wurde in Infektionsassays nicht transloziert. Eine analoge CagA-Variante des *H. pylori*-Stammes NCTC11637 erwies sich nach Transfektion in AGS-Zellen hinsichtlich Membranrekrutierung, Tyrosinphosphorylierung und Induktion des *hummingbird*-Phänotyps als funktionell (115). Bezüglich der Translokation scheint also ein Bereich im N-Terminus des CagA-Proteins größer als 57 Aminosäuren notwendig zu sein.

Eine mögliche Erklärung für die Notwendigkeit des N-Terminus sowie des C-Terminus wäre, dass CagA nicht über ein lineares, sondern ein konformationelles Signal verfügt. Die Beteiligung des N-terminalen Molekülbereichs an einem solchen dreidimensionalen Signal, wie für verschiedene Typ II-sekretierte Proteine vorgeschlagen wurde (174,198,248), scheint für CagA jedoch eher unwahrscheinlich zu sein. Da das Fusionsprotein GFP-CagA (C-term.) einen dominant-negativen Effekt auf die Translokation des *wt* CagA-Proteins ausübt, scheint die C-terminale Hälfte ausreichend zu sein, um CagA zum Sekretionsapparat zu rekrutieren. Sehr wahrscheinlich erscheint hingegen, dass es sich bei der CagA-Translokation um einen 2-stufigen Mechanismus handelt. Dies wurde bereits für andere T4SS vorgeschlagen (40,45,175).

In *A. tumefaciens* konnten tatsächlich schon geringe Mengen translozierter Substrate im periplasmatischen Raum nachgewiesen werden (49). Der entsprechende Nachweis ist bei *H. pylori* jedoch noch nicht gelungen. Dieser These zufolge wäre der C-Terminus notwendig, um CagA zum Sekretionsapparat zu rekrutieren und den Transport über die Cytoplasmamembran zu vermitteln. Der N-Terminus hingegen ist möglicherweise in einem der nachfolgenden Schritte essentiell, um über den Kanal sekretiert zu werden. Hier erscheint eine Interaktion mit periplasmatischen Proteinen, wie z. B. dem Translokationsfaktor CagI und / oder Apparatskomponenten wahrscheinlich. So konnte z. B. bereits gezeigt werden, dass das äußere Membranprotein VirB9 in *A. tumefaciens* eine Domäne für die Substraterkennung und –selektion aufweist (123).

Mit Hilfe weiterführender Deletionen interner Bereiche im C-terminalen Teil des CagA-Moleküls konnte klar gezeigt werden, dass die EPIYA-Region nicht notwendig ist für eine erfolgreiche Translokation. Eine Ausweitung der deletierten Region auf die Aminosäuren 695-1019 (pRL5) hatte ebenfalls keinerlei Einfluss auf die Effizienz der CagA-Sekretion in Epithelzellen. Nach Deletion weiterer 80 Aminosäuren stromaufwärts (pIP30) konnte jedoch keine GSK-Phosphorylierung mehr nachgewiesen werden. Eine geringfügig schwächere Expression von pIP30 im Vergleich zu pRL5 hat keinen Einfluss auf die Nachweisbarkeit. Demzufolge scheint der Bereich der Aminosäuren 614 bis 695 für die CagA-Translokation notwendig zu sein. Gerade in diesem Bereich sind laut bioinformatischen Strukturvorhersagen *coiled-coil*-Strukturen sehr wahrscheinlich (siehe Anhang Abb. 45). Es handelt es sich daher möglicherweise um eine Region, die für Protein-Protein-Interaktionen benötigt wird.

## 2.2 Funktionelle CagA-Domänen in der Wirtszelle

CagA bewirkt nach seiner Translokation in der Wirtszelle zahlreiche Veränderungen, die teilweise abhängig und teilweise unabhängig von einer Tyrosinphosphorylierung sind. Es wird angenommen, dass die Phosphorylierung des CagA-Moleküls durch Src-Kinasen an der Plasmamembran der Zelle stattfindet (211). Die Bereiche des CagA-Moleküls, welche nach erfolgter Translokation für eine Rekrutierung an die Membran notwendig sind, konnten bisher jedoch noch nicht eindeutig identifiziert werden. So postulieren Higashi *et al.* (115), dass die EPIYA-Motive das Membranlokalisierungssignal darstellen, allerdings unabhängig von einer Phosphorylierung. Es konnte gezeigt werden, dass eine Deletion der EPIYA-Region die Assoziation von CagA mit der Membran verhindert. Durch Wiedereinführung eines einzelnen EPIYA-Motives konnte die Membranrekrutierung wieder erfolgen. Weiterhin wurde dargestellt, dass eine phosphorylierungsresistente CagA-Variante zwar noch an der Membran lokalisiert ist, es aber nicht zur Induktion des *hummingbird*-Phänotyps kommt.

In dieser Arbeit wurde anhand von GFP-Fusionen demonstriert, dass die EPIYA-Motive *per se* nicht ausreichend sind, um eine Membranlokalisierung zu bewirken. Durch Fusion mit einem cytoplasmatischen Protein konnten ähnliche Ergebnisse bereits gezeigt werden (115). Dies lässt darauf schließen, dass wahrscheinlich ein anderer Molekülbereich notwendig ist, um die Membranverankerung zu bewirken. Bagnoli *et al.* (19) konnten zeigen, dass die C-terminale Hälfte des CagA-Proteins (AA 871-1216) des *H. pylori*-Stammes G27 als GFP-Fusion cytoplasmatisch vorliegt. Bei Co-Expression mit dem N-terminalen Molekülteil (AA 1-877) kommt es zur molekularen Interaktion der beiden Domänen und zur Lokalisation an die Zell-Zell *junctions*. Der C-Terminus alleine ist ausreichend, um eine Elongation der Zellmorphologie auszulösen. Weiterhin wird postuliert, dass der N-Terminus an sich die Lokalisation bedingt. Dies steht der Beobachtung entgegen, dass eine GFP-CagA (602-1214)-Fusion eindeutig an der Membran lokalisiert ist. Zusammengefasst könnte also der Aminosäurebereich von ca. 600 bis 871 für die Membranrekrutierung notwendig sein.



Durch Infektionsexperimente mit phosphorylierungsresistenten CagA-Varianten, wurde gezeigt, dass CagA erst in phosphoryliertem Zustand den *hummingbird*-Phänotyp induziert. Das CagA-Molekül des Stammes 11637 enthält 5 EPIYA-Motive: ABCCC. Die Phosphorylierung findet vor allem an den Motiven des C-Typs statt (158). Durch das Wildtyp-Protein erfolgte eine starke *hummingbird*-Induktion, mutierte Tyrosine der AB-Motive zeigten eine leicht verringerte Fähigkeit, während die Ausbildung dieses Phänotyps durch Mutationen im Bereich der CCC-EPIYA-Motive stark beeinträchtigt war. Nach dem Austausch aller Tyrosine gegen Phenylalanin (FFFFFF) konnte keine Veränderung der Zellmorphologie beobachtet werden. Die Stärke der Induktion des *hummingbird*-Phänotyps korreliert eindeutig mit der Anzahl der phosphorylierbaren Tyrosinreste. Diese Daten lassen sich durch Literaturquellen absichern (113), die zeigen, dass das CagA-Molekül zur Induktion des *hummingbird*-Phänotyps mindestens ein phosphorylierbares Tyrosin enthalten muss. In der vorliegenden Arbeit konnte weiterhin gezeigt werden, dass der Molekülbereich um die EPIYA-Region (Aminosäuren 847-1033) ausreicht, um diese charakteristischen Veränderungen des Aktincytoskeletts zu bewirken. Daher stellt sich die Frage, ob eine Phosphorylierung des CagA-Moleküls bereits im Cytoplasma stattfindet. Die Membranverankerung bzw. eine notwendige Dimerisierung von CagA (188) könnte die Bereiche stromauf- oder stromabwärts dieser Region benötigen.

CagA wird in Phagocyten in ein tyrosinphosphoryliertes 40 kDa und ein 100 kDa Fragment gespalten. Die Frage, ob die Phosphorylierung des CagA-Moleküls der Prozessierung vorangeht oder die Voraussetzung dafür ist (Interaktion der Protease mit phosphoryliertem CagA), konnte in dieser Arbeit beantwortet werden. So werden CagA-Moleküle mit mutierten Tyrosinen (Y → F) genauso wie *wt* Moleküle gespalten. Experimente, in denen die Zellen vor der Infektion mit den Kinaseinhibitoren PP1 und Genistein behandelt wurden, zeigten, dass CagA dann nicht prozessiert wird (92). Diese beiden Ergebnisse könnten bedeuten, dass die CagA-spaltende Protease durch eigene Phosphorylierung aktiviert wird. Bleibt diese aus, kann CagA nicht gespalten werden. Eine weitere Erklärung wäre, dass EPIYA-unabhängig phosphoryliertes CagA durch Autoproteolyse (155) an definierter Position in zwei Untereinheiten gespalten wird.

### 3 Potentielle Effektorproteine

Das CagA-Protein ist einer der wichtigsten Virulenzfaktoren von *H. pylori* und wird mit zahlreichen Funktionen in der Wirtszelle assoziiert. Trotzdem erscheint es unwahrscheinlich, dass ein solch komplexes Sekretionssystem für den Transport „nur“ eines Substrates dienen soll. Des Weiteren sind Effekte wie z. B. die Apoptose-Induktion in humanen Monocyten (90) beschrieben worden, die *cag*-PAI abhängig stattfinden, jedoch nicht durch CagA bewirkt werden. Dies lässt die Vermutung aufkommen, dass es noch weitere, bisher nicht identifizierte Effektoren geben muss. Die schwachen Homologien der C-terminalen Bereiche verschiedener Typ IV-sekretierter Proteine sind jedoch nicht ausreichend, um Vorhersagen für andere mögliche translozierte Proteine des Cag-T4SS zu machen. Die „konservierten Bereiche“ des CagA-Proteins, die sich als weder notwendig noch ausreichend für die Translokation erwiesen haben, waren nicht spezifisch genug, um interessante Kandidaten bioinformatisch einzugrenzen. Aufgrund dessen wurden einige potentielle Effektorproteine, die auf der *cag*-PAI codiert sind, anhand des GSK-Phosphorylierungsassays auf Translokation überprüft. Bei keinem der exprimierten GSK-getaggtten Proteine (Cag $\zeta$ , Cag $\epsilon$ , CagS und CagQ) konnte eine Translokation unter den getesteten Bedingungen festgestellt werden. *In vitro*-Phosphorylierungsexperimente mit Zelllysaten zeigten immerhin die Zugänglichkeit des GSK-Tags für zelluläre Kinasen und damit, dass die fehlende Phosphorylierung wahrscheinlich auf eine fehlende Translokation zurückzuführen ist.

Interessanterweise konnte bei diesen Proteinen eine äußerst unterschiedlich starke Expression beobachtet werden. Dies lässt darauf schließen, dass die Regulation wahrscheinlich über die Stabilität der mRNA oder auf Proteinebene stattfindet. So kann aufgrund der starken Expression von *gsk-cag $\zeta$*  vermutet werden, dass Cag $\zeta$  sehr stabil ist. Eine wichtige virulenzassoziierte Rolle kann auch aufgrund der starken *in vivo*-Expression vermutet werden (32,33). Im Rahmen dieser Arbeit ist es leider nicht gelungen, eine Translokation oder andere Funktion dieses Proteins nachzuweisen. Die beobachtete Zunahme der Gesamtmenge an Cag $\zeta$  in längeren Infektionen korreliert mit der Wachstumsrate der Bakterien. Ein Zusammenhang zwischen Wachstumsphase und Expression, wie von Boonjakuakul *et al.* postuliert (32), wurde nicht überprüft.

Viele bakterielle Toxine werden nach Translokation in die Wirtszelle in unterschiedliche zelluläre Kompartimente rekrutiert, wie z. B. Mitochondrien (Map in enteropathogenen *E. coli*) (177) oder den Golgi-Apparat (NleA in enterohämorrhagischen *E. coli*) (102). Auch eine Kernlokalisation wurde bei YopM in *Yersinia* festgestellt (217,218). Da dadurch eine Zugänglichkeit des GSK-Tags für zelluläre Kinasen beeinträchtigt sein könnte, wurden GFP-Fusionen der Proteine Cag $\epsilon$ , Cag $\zeta$  und CagF als Kontrolle hergestellt und nach Transfektion die Lokalisation fluoreszenzmikroskopisch überprüft. Cag $\epsilon$  zeichnet sich durch eine putative Kernlokalisationssequenz aus und weist eventuell nukleotidbindende Eigenschaften auf. Allerdings lokalisiert das Protein unter den vorliegenden experimentellen Bedingungen nicht in den Zellkern. Dies kann daran liegen, dass bisher unbekannte Faktoren eine Rolle spielen, die bei den entsprechenden Experimenten nicht berücksichtigt wurden. Andererseits stammen Typ IV-Sekretionssysteme pathogener Bakterien von konjugativen DNA-Transfersystemen ab (254). Daher könnte diese, bisher noch nicht gezeigte, Funktion durchaus der Rest einer ursprünglichen Aktivität sein. Diese Annahme beruht auch darauf, dass *cag $\epsilon$*  in einigen Stämmen komplett fehlt, teilweise kein Stopcodon mehr vorhanden ist und es daher zu einer Fusion mit dem stromabwärts codierten Cag $\delta$  kommt. Im Stamm 26695 hingegen liegt eine Leserasterverschiebung vor, die einen vorzeitigen Translationsstop bewirkt (14,30,46,236). Zusammengenommen scheint dies auf einen geringen Selektionsdruck hinzudeuten. Bei der Lokalisation des Fusionsproteins GFP-Cag $\zeta$  handelt es sich möglicherweise um Strukturen des endoplasmatischen Retikulums (ER). Eine genauere Aussage wäre allerdings erst durch eine Colokalisation mit den entsprechenden zellulären Markern möglich. Eine theoretische Lokalisation des Proteins nach Translokation im ER würde eine GSK-Phosphorylierung und damit den Nachweis einer erfolgten Sekretion in das Wirtszellcytosol möglicherweise verhindern. Bei keinem der untersuchten Proteine konnte unter den gegebenen experimentellen Bedingungen ein Hinweis auf Translokation in eukaryotische Zielzellen gefunden werden. Vielleicht ist CagA doch das einzige Effektorprotein, das aufgrund seiner vielen funktionellen Domänen eine Vielzahl von Effekten auf Wirtszellen ausübt. Obwohl dies für T4SS ungewöhnlich ist, zeichnen sich doch fast alle bekannten Systeme durch mehrere Effektoren aus (16), ist auch im Ptl-System von *Bordetella pertussis* nur ein Substrat bekannt.

## 4 Das Kopplungsprotein Cag $\beta$

Bei der Frage nach dem Protein, das für die Signalerkennung Typ IV-sekretierter Effektoren zuständig ist, scheinen die so genannten Kopplungsproteine gut geeignete Kandidaten zu sein (52,99). Zu dieser Gruppe zählen die Proteine TraG und TrwB der konjugativen Plasmide RP4 bzw. R388 sowie das VirD4-Protein in *A. tumefaciens* (45,52,139). Eine Interaktion dieser Proteine mit dem jeweiligen VirB10-homologen Protein wurde bereits nachgewiesen (140). Von Kopplungsproteinen wird angenommen, dass sie den zugehörigen Relaxosomen-Komplex binden und dem Sekretionsapparat zuführen.

In *A. tumefaciens* interagiert das Kopplungsprotein VirD4 mit dem translozierten Substrat VirE2 (13) an den bakteriellen Zellpolen (130). GFP-Fusionen mit dem C-Terminus des Proteins VirE2 zeigen eine Anhäufung an den Polen der Bakterienzelle (13). Interessanterweise ist für den Transport des Pertussis-Toxins aus *B. pertussis*, welches keine C-terminale Signalsequenz enthält, auch kein Kopplungsprotein notwendig. Hier erfolgt die Sekretion in einem 2-Stufen-Prozess: Die Translokation über die innere Membran erfolgt Sec-abhängig, der Transport über die äußere Membran wird hingegen durch das Ptl-T4SS vermittelt (39). Die Abwesenheit eines VirD4-homologen Proteins in *Bordetella* lässt vermuten, dass das ursprüngliche Kopplungsprotein dieses Systems im Laufe der Evolution durch das Sec-System ersetzt wurde.

In *H. pylori* ist das zu VirD4 homologe Protein Cag $\beta$  (HP524) für die CagA-Translokation notwendig, nicht jedoch für die CagA-unabhängige IL-8-Induktion und damit den Aufbau des Sekretionsapparates (87).

Cag $\beta$  ist in der cytoplasmatischen Membran lokalisiert, und weist im N-terminalen Bereich drei Transmembrandomänen auf, wobei der N-Terminus ins Periplasma ragt. Der stromabwärts der Transmembrandomänen lokalisierte Teil des Moleküls liegt im Cytoplasma. Cag $\beta$  assoziiert mit sich selbst (41) und bildet Oligomere mit vier oder fünf Untereinheiten, die wahrscheinlich eine Pore in der inneren Membran bilden und spezifisch von sekretierten Substraten erkannt werden (205). Cag $\beta$  könnte somit als Transporter für die Sekretion ins Periplasma fungieren.

Eine Funktion als Kopplungsprotein wird dadurch unterstützt, dass Cag $\beta$  eine ATPase-Funktion aufweist. Dadurch werden energieaufwändige Prozesse wie Entfaltung des Substrates oder Konformationsänderungen des Kopplungsproteins möglich. Zusätzlich weisen EF-Hand-Motive auf eine Ca<sup>2+</sup>-Bindedomäne hin, was dem Molekül eine Funktion als Calciumsensor zusprechen könnte. In T3SS bei *Yersinia* ist bekannt, dass niedrige Calcium-Werte die Translokation induzieren (69).

Die Interaktion von Cag $\beta$  mit dem CagA-Protein konnte in dieser Arbeit zum ersten Mal gezeigt werden. Dies könnte der entscheidende Schritt sein, da hier vielleicht die Signalerkennung erfolgt und das Effektorprotein anschließend dem Translokationsprozess durch den Sekretionsapparat zugeführt wird. Allerdings sind weitere Experimente nötig, um die Wechselwirkung zwischen Cag $\beta$  und CagA genauer zu charakterisieren.

## 5 Das Sekretions-Chaperon CagF

Vier auf der *cag*-Pathogenitätsinsel codierte Proteine, die so genannten Translokationsfaktoren CagF, CagI, CagZ und Cag $\beta$ , sind neben den Apparatsproteinen notwendig für die CagA-Translokation (87). Die Identifizierung von CagF als ein mit CagA interagierendes Protein und dessen Charakterisierung als Sekretions-Chaperon für CagA sind wichtige Schritte für die Aufklärung des molekularen Mechanismus der CagA-Translokation. Sekretions-Chaperone sind in vielen Proteinsekretionssystemen wichtig und wurden vor allem in Typ III-Systemen umfassend charakterisiert (7,83). Hier besteht ihre Funktion meist darin, Stabilität und Sekretionskompetenz der zugehörigen Effektorproteine zu vermitteln bzw. aufrecht zu erhalten.

Dies beinhaltet z. B. die Aggregation des zugehörigen Substrates zu verhindern (172), dieses in einem ungefalteten Zustand zu halten (223), verfrühte und nicht-produktive Interaktionen zu verhindern und / oder die Rekrutierung zum Sekretionsapparat zu vermitteln (23). In einigen Fällen ist eine Translokation jedoch nicht zwingend abhängig von der Anwesenheit von Chaperonen, hier wird durch Chaperone eine Hierarchie in der Sekretionsreihenfolge der Effektoren reguliert (35,257).

Letzelter *et al.* postulieren sogar, dass Effektorproteine, die in der Wirtszelle an die Membran lokalisieren, auf der bakteriellen Seite ein Chaperon benötigen, um diese Membran-Lokalisations-Domäne (MLD) zu maskieren, und so eine unproduktive Aggregation zu verhindern (136). Dies ist bei CagA nicht der Fall, da der C-terminale Molekülbereich ab Aminosäure 1019 nach AGS-Zell-Infektion nicht an die Membran rekrutiert wird (siehe Abb. 14), jedoch ausreichend ist für die CagF-Bindung. Bagnoli *et al.* zeigten durch Cotransfektion, dass dieser Bereich nur durch Assoziation mit dem 100 kDa N-terminalen Molekülteil an der Plasmamembran nachzuweisen ist (19).

In Typ IV-Sekretionssystemen wurden Sekretions-Chaperone bisher für das VirB/D4-System in *A. tumefaciens* und das Dot/Icm-System in *L. pneumophila* beschrieben. So wurde gezeigt, dass die Translokation des Effektorproteins VirE2 von *A. tumefaciens* in Pflanzenzellen von dem Chaperonprotein VirE1 abhängt (72,228,229). In *L. pneumophila* sind die Proteine IcmS, IcmW und LvgA für die Translokation einiger Substrate in das Cytosol der Wirtszelle notwendig, und werden als Typ IV-Adaptoren bezeichnet. Eine Chaperon-ähnliche Funktion ist hier sehr wahrscheinlich (245). Die Funktion des Sekretions-Chaperons VirE1 ist wesentlich genauer bekannt. So konnte gezeigt werden, dass das Protein VirE2 mit sich selbst assoziiert, die Interaktion mit VirE1 jedoch wesentlich stärker ist und das Chaperon somit eine Aggregation von VirE2 verhindert. Der VirE2-VirE2-Interaktionsbereich überlappt stark mit einer der beiden VirE1-Bindedomänen. Zusätzlich erhöht sich bei Anwesenheit von VirE1 die Löslichkeit von VirE2 in *E. coli*-Extrakten um ein Vielfaches (72).

Die Identifikation von CagF als mengenmäßig hauptsächlichen Interaktionspartner von CagA weist diesem Protein eine bedeutende Rolle zu. In Abb. 20, einer über SDS-PAGE aufgetrennten und silbergefärbten Immunpräzipitation von CagA, interagiert nur ein Protein in ausreichenden Mengen: CagF. Diese Interaktion, die in den Wildtyp-Stämmen P12 und 26695 gezeigt werden konnte, findet unabhängig von einem funktionellen Cag-T4SS statt.

Besonders aufschlussreich ist der erfolgreiche Nachweis einer Interaktion von CagA und CagF in *E. coli* durch zwei unabhängige Methoden: den BiFC-Assay und GST-pulldown-Experimente. Dadurch konnte der Beweis erbracht werden, dass es sich um eine direkte Interaktion handelt und keine weiteren *H. pylori*-Proteine involviert sind. Daher kann davon ausgegangen werden, dass es sich hierbei um einen der CagA-Translokation vorausgehenden Schritt handelt. Um zu überprüfen, ob das CagF-Protein zusammen mit CagA ein Substrat für die Translokation darstellt, wurde der GSK-Phosphorylierungs-Assay durchgeführt. Dieser Test zeigte, dass CagF nicht in die Wirtszelle transferiert wird. Fraktionierungsexperimente mit infizierten AGS-Zellen (59) zeigten ebenfalls, dass CagF nicht in AGS-Zellen transloziert wird.

## 5.1 Lokalisation CagF

Für eine mögliche Funktion als Sekretions-Chaperon wäre eine cytoplasmatische Lokalisation des CagF-Proteins nahe liegend. Die Aufklärung der Lokalisation war somit grundlegend für weitere Funktionsanalysen. Seydel *et al.* postulierten, dass CagF als immunogenes Protein auf der Bakterienoberfläche lokalisiert sei (214). Da es in der vorliegenden Arbeit nicht gelang, CagF mittels Immunfluoreszenzfärbung mit Hilfe des Antiserums AK284 auf der Zelloberfläche darzustellen (Daten nicht gezeigt), wurden zunächst Proteaseverdaue mit ganzen Zellen, osmotisch geschockten Zellen und Zelllysaten durchgeführt. Durch diese Experimente zeigte sich, dass eine Lokalisation im Cytoplasma am wahrscheinlichsten ist.

In ganzen Zellen konnte im Gegensatz zu Seydel *et al.* kein Abbau durch Trypsin festgestellt werden. Ein Grund hierfür mag darin liegen, dass bei Arbeiten mit *H. pylori* häufig eine Lyse der Zellen zu beobachten ist. Aussagekräftige Kontrollen wie Proteine bekannter Lokalisation, sowie ein optimiertes Versuchsprotokoll sind zwingend nötig. Da in der zitierten Arbeit keinerlei Kontrollblots gezeigt werden, sind die von den Autoren postulierten Daten nicht verlässlich. Abgesichert durch die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation lässt sich eine Lokalisation auf der Bakterienzelloberfläche ausschließen.

Zellfraktionierungsexperimente, die eine Auftrennung in eine lösliche Fraktion und eine Membranfraktion erlauben, zeigten, dass CagF in beiden nachzuweisen ist. In einem weiteren, aussagekräftigen Experiment konnte durch Extraktion mit dem Detergenz Triton X-100 gezeigt werden, dass CagF nicht mit der äußeren Membran assoziiert vorliegt. Die meisten Proteine innerer Membranen gramnegativer Bakterien sind in dem nicht-ionischen Detergenz Triton X-100 löslich, während Proteine der äußeren Membran sich typischerweise unlöslich verhalten (160). Durch Inkubation mit NaCl, welches hydrophobe Wechselwirkungen stört, konnte das CagF-Protein vollständig in Lösung gebracht werden. Dies zeigt deutlich, dass es sich hierbei nicht um ein integrales Membranprotein handelt, sondern ausschließlich eine periphere Assoziation vorliegt. Das integrale Membranprotein ComB8 (116) verblieb als entsprechende Kontrolle in der Membranfraktion. Im Bereich der Aminosäuren 147 bis 164 wird durch Strukturvorhersageprogramme (6,125) eine mögliche Transmembrandomäne im CagF-Molekül angezeigt. Dieser Molekülbereich ist stark hydrophob, in Anbetracht der NaCl-Extrahierbarkeit aber wahrscheinlich die Region im Protein, die für die periphere Assoziation mit der cytoplasmatischen Membran notwendig ist.

Die durch Fluoreszenzmikroskopie beobachtete fleckenförmige Verteilung eines funktionellen CagF-GFP-Fusionsproteins, die auch bei einfacher Immunfluoreszenzfärbung vorliegt (Daten nicht gezeigt), ließ die Vermutung aufkommen, dass eben diese Anordnung der Apparatslokalisation entspricht. Ähnliche Ergebnisse konnten durch Anfärbung von *H. pylori*-Zellen mit einem Antikörper gegen CagT gezeigt werden. CagT ist auf der Zelloberfläche an der Basis der Apparatsstruktur lokalisiert.

In vorangegangenen Arbeiten wurde eine ähnliche punktförmige Lokalisation der Proteine CagY und CagT in Einzelfärbungen dargestellt (38). Elektronenmikroskopische Aufnahmen (190) bestätigen diese Anordnung der Sekretionsapparate, die im Gegensatz zum VirB/D4-System in *Agrobacterium* steht. Hier wird eine bevorzugte polare Anordnung der T4SS vorgefunden (124,130).



Eine Lokalisation des Sekretions-Chaperons CagF in räumlicher Nähe des Sekretionsapparates wurde anhand von Doppelimmunfluoreszenzfärbung und konfokaler Mikroskopie nachgewiesen. Die direkte Interaktion mit der putativen kanalbildenden Komponente des Systems, CagY, konnte mittels GST-*pull-down*-Assay und auch durch Immunpräzipitation nicht eindeutig gezeigt werden. In Protein-Interaktionsstudien anhand eines *yeast two hybrid*-Systems zeigten jedoch Busler *et al.*, dass der cytoplasmatische Bereich des Proteins CagY eine starke Interaktion mit CagF eingeht (41). Durch die Lokalisation in Apparatsnähe und die Interaktion mit einem Apparatsprotein, liegt die Vermutung nahe, dass CagF eine Rekrutierungs- und Vermittlungsfunktion zwischen CagA und dem Cag-T4SS einnimmt.

Die Möglichkeit, dass CagF als Rekrutierungsfaktor CagA im Cytoplasma der Bakterienzelle bindet und an die Membran in Apparatsnähe geleitet, war naheliegend und wurde mittels Zellfraktionierungen und anschließender CagA-Immunpräzipitation überprüft. Die Interaktion CagA-CagF konnte vorwiegend in der Membranfraktion nachgewiesen werden. Des Weiteren waren beide Proteine bei einer Deletion des Interaktionspartners unverändert im Cytoplasma und an der Membran lokalisiert. CagA und CagF gehen also unabhängig von einander an die Cytoplasmamembran, an welcher dann die Interaktion stattfindet, d.h. keiner der Partner hat eine Rekrutierungsfunktion für den andern. CagF scheint weiterhin keinen Einfluss auf die Stabilität des CagA-Proteins zu haben, da dieses in der Mutante in unveränderter Menge vorliegt.

## 5.2 Charakterisierung der Chaperon-Binde-Domäne

Die Interaktionsdomäne auf dem CagA-Protein wurde in umfangreichen GST-*pull-down*-Experimenten mit verschiedenen CagA-Varianten eingegrenzt. Die Chaperon-Binde-Domäne (CBD) bzw. der Bereich, der ausreichend ist für die Bindung von CagF an das CagA-Protein, konnte auf die Aminosäurereste 1019 bis 1123 eingegrenzt werden. Die Bindedomäne des CagF-Chaperons liegt somit direkt stromaufwärts des C-terminalen CagA-Translokationssignals. Die Aminosäuresequenz der CBD und Sekundärstrukturvorhersagen sind im Anhang dargestellt (Abb. 46).

In Typ III-Chaperonen ist das vorherrschende Strukturmerkmal der interagierenden Molekülbereiche eine  $\alpha$ -helicale *coiled-coil*-Struktur (71,173). Diese besteht aus zwei oder mehr rechtsgerichteten amphipatischen  $\alpha$ -Helices, die umeinander gewunden in einer linksdrehenden Superhelix angeordnet sind (56). *Coiled-coil*-Motive sind ubiquitär verbreitet und sehr häufig in Interaktionsbereichen vieler Struktur- und Regulatorproteine zu finden. Das Vorkommen dieser Domänen in sekretierten Effektorproteinen wurde bereits mehrfach gezeigt. CagA und CagF wurden bioinformatisch mit Hilfe des Vorhersageprogrammes „COILS“ auf dieses Strukturmotiv überprüft (5,142). Dabei wurden zwei unterschiedliche Matrizen, MTK und MTIDK, eingesetzt, um zuverlässige Aussagen ermöglichen. Das CagA-Molekül zeigt vier Bereiche, die mit hoher Wahrscheinlichkeit eine *coiled-coil* Konformation einnehmen (siehe Anhang). Abbildung 41 zeigt eine schematische Zusammenstellung verschiedener CagA-Molekülbereiche. Im Zusammenhang mit der Chaperoninteraktion sind vor allem die Aminosäuren 1025 bis 1049 interessant. Das CagF-Protein zeigt am N-Terminus (AA 29-49) ebenfalls dieses Strukturmerkmal. Dies lässt die, experimentell noch zu überprüfende, Vermutung zu, dass es sich hierbei um den Interaktionsmechanismus handelt. Sehr aufschlussreich wäre natürlich eine Co-Kristallisation von CagA mit CagF. Dies würde erhebliche Informationen über den Bereich und die Art der Interaktion bringen und es erlauben, die genaue Funktion des Chaperons zu charakterisieren.

### 5.3 CagF ist ein Dimer und hat Chaperoneigenschaften

Nach heterologer Expression von GST-CagF, der Reinigung des Fusionsproteins und Abspaltung des GST-Teils konnte durch Gelfiltrationsexperimente gezeigt werden, dass CagF in Lösung ein Molekulargewicht von etwa 72 kDa aufweist und damit eindeutig als Dimer vorliegt. Die Coexpression von CagF mit seinem Substrat GST-CagA und die Affinitätsreinigung mittels Glutathion-Sepharose ergaben, dass CagA im Komplex mit 2 bis 3 Molekülen CagF eluiert. Angesichts der dimeren Form des CagF-Proteins erscheint die 1:2 Stöchiometrie und somit die Bildung eines heterotrimeren Komplexes eher wahrscheinlich.

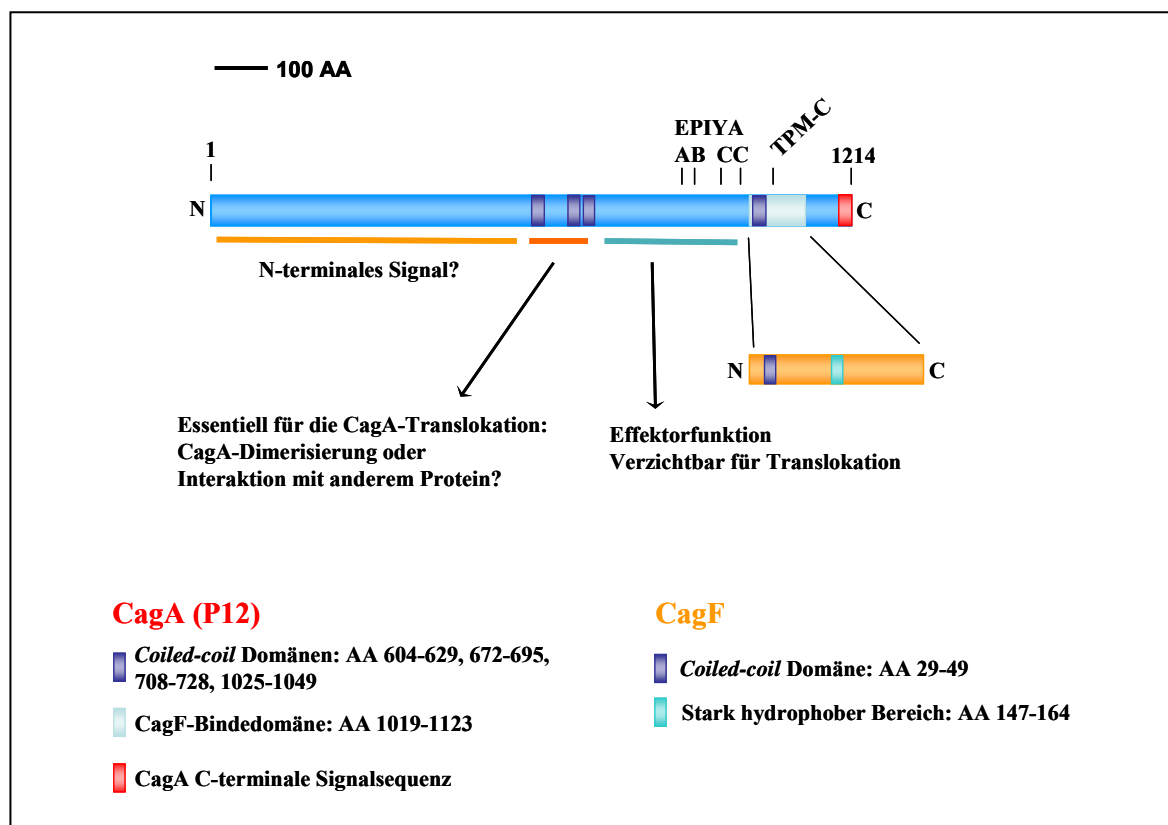
Diese Zusammensetzung von Effektor-Sekretions-Chaperon-Komplexen ist in T3SS weit verbreitet. So interagieren SycO mit seinem Effektor YopO, SycE mit YopE und SycT mit YopT ebenfalls im Verhältnis 2:1 (27,42,136). Darüberhinaus weist das CagF-Molekül weitere Merkmale auf, die typisch sind für Typ III-Sekretions-Chaperone: ein saurer isoelektrischer Punkt (pI 4,5) und ein hoher Anteil an vorhergesagten  $\alpha$ -Helices. Mit einer Größe von 36 kDa ist es allerdings wesentlich größer als andere Sekretions-Chaperone, die in der Regel ein Molekulargewicht von weniger als 20 kDa aufweisen.

Weiterhin ist CagF essentiell für die CagA-Translokation, wird jedoch selbst nicht transloziert. Am Aufbau des Apparates ist es nicht beteiligt, da CagF nicht für die CagA-unabhängige Induktion von IL-8 notwendig ist. Die CagF-Bindedomäne auf dem CagA-Protein liegt unmittelbar stromaufwärts des C-terminalen Sekretionssignals. Entsprechend kann die CBD bei Typ III-Systemen direkt stromabwärts der N-terminalen Signalsequenz eingegrenzt werden. Die CagF-Bindedomäne ist, zusammen mit der C-terminalen Signalregion, ausreichend um den dominant-negativen Effekt mit GFP-Fusionen auszuüben. Da Fusionen anderer Tags (GSK, m45) nicht diese Auswirkung haben, ist es unwahrscheinlich, dass dies nur durch Konkurrenz um die CagF-Bindung ausgelöst wird. Vielmehr scheint CagF in die Rekrutierung von CagA zum Sekretionsapparat involviert zu sein. Eine ähnliche Funktion wurde ebenfalls für einige Typ III-Chaperone vorgeschlagen (51,135).

## 6 Translokationsmechanismus

Die Interaktion des CagA-Proteins mit seinem dimeren Sekretions-Chaperon CagF ist eine äußerst spezifische und sehr starke Interaktion. In allen experimentellen Ansätzen (Immunpräzipitation, Fluoreszenzkomplementation, GST-pulldown, Gelfiltration nach Coexpression) konnte dies gezeigt werden. Auch mengenmäßig scheint hier ein massiver Unterschied zu anderen Interaktionen des CagA-Proteins vorzuliegen (vgl. Abb. 20). Zusätzlich ist die Wechselwirkung unabhängig von einem funktionellen Apparat und insbesondere von den Translokationsfaktoren.

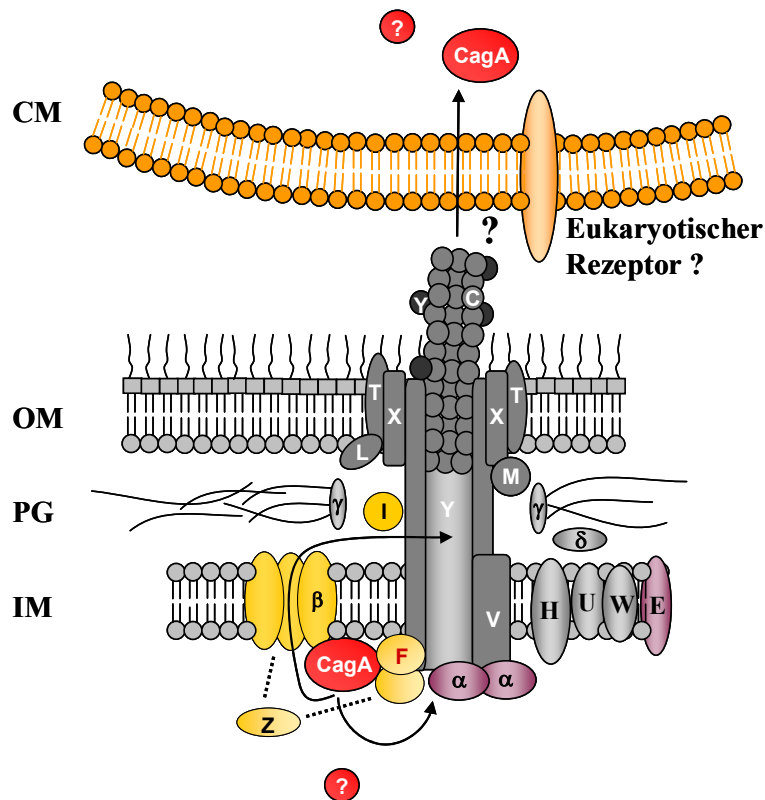
Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Bindung des CagF-Proteins auf jeden Fall der Erkennung des CagA-Translokationssignals vorausgeht und eventuell eine Art Qualitätskontrolle darstellt. Möglich wäre jedoch auch, dass CagF durch seine Bindung mit hoher Affinität einzelne CagA-Moleküle aus einem multimeren CagA-Komplex herauslöst und so für den Transport vorbereitet. Die CBD liegt in jenem Bereich des CagA-Moleküls, welcher mit dem 100 kDa N-terminalen Teil interagiert (19).



**Abb. 41: Schematische Darstellung des CagA-Proteins.** Bereiche des CagA-Moleküls, denen eine bestimmte Funktion zugewiesen werden konnte und Ergebnisse von Sekundärstrukturvorhersagen sind farblich hervorgehoben und in der Legende aufgeführt (Erläuterungen siehe Text).

Die *coiled-coil* Struktur, die im Bereich der CBD liegt und für die Interaktion mit CagF notwendig sein könnte, kann ebenfalls die Dimerisierung mit dem vorderen Proteinbereich bewirken. Bei der hierfür notwendigen Region wäre der Aminosäurebereich zwischen Position 614 und 694 denkbar. Ren *et al.* (188) hingegen postulieren ein Aminosäuresequenzmotiv, welches für die CagA-Dimerisierung nach der Translokation in Zielzellen notwendig ist. Im CagA-Molekül des Stammes P12 sind zwei dieser FPLX<sub>5</sub>VXDLSKVG-Motive enthalten. Eines davon überlappt teilweise mit dem vorderen Bereich der CBD, korreliert jedoch nicht mit vorhergesagten *coiled-coil*-Strukturen. Alternativ oder zusätzlich wäre auch eine CagF-vermittelte Änderung der Molekülstruktur, die eine Art strukturelles Sekretionssignal darstellt, möglich. Dieses monomere CagA könnte dann die korrekte Konformation für die Erkennung durch das Kopplungsprotein Cag $\beta$  vorweisen.

Bei Versuchen, eine Interaktion von CagF mit dem Kopplungsprotein Cag $\beta$  zu zeigen, war stets nur der Komplex CagA-Cag $\beta$  nachzuweisen, und in keinem Fall konnte CagF co-präzipitiert werden. Daraus lässt sich schließen, dass CagA entweder mit CagF oder mit Cag $\beta$  assoziieren kann, aber kein Dreierkomplex möglich ist. Denkbar wäre, dass es sich bei der CagF-CBD auf dem CagA-Molekül um denselben Bereich handelt, der für die Interaktion mit dem Kopplungsprotein notwendig ist. Da für Kopplungsproteine spekuliert wird, dass sie für die Signalerkennung notwendig sind, kämen bei CagA eher die 20 C-terminalen Aminosäuren in Frage. Möglich wäre jedoch auch, dass Cag $\beta$  diese Signalsequenz erkennt, eine Bindung jedoch etwas stromaufwärts erfolgt, bzw. dass die Interaktion im Bereich der CBD stattfindet, aber weitere Translokations-initiiierende Schritte, wie z. B. Öffnung des Kanalbereichs durch Konformationsänderungen, durch das Sekretionssignal bewirkt werden. In Infektionsexperimenten (Daten nicht dargestellt) konnte gezeigt werden, dass die Fusion eines kurzen, 18 Aminosäuren langen, Tags (m45) an den C-Terminus des CagA-Proteins die Translokation nicht behindert, ein freier C-Terminus also nicht notwendig ist.



**Abb. 42: Modell des Cag-Typ IV-Sekretionssystems.** Die Lokalisation der einzelnen Proteine ist nach dem aktuellen Wissensstand dargestellt. Die Farbgebung spiegelt die Funktion wieder: Grau dargestellt sind Apparatskomponenten, gelb Translokationsfaktoren, violett die Homologen der ATPasen VirB11 und VirB4 in *A. tumefaciens* Cagα und CagE, rot CagA und putative andere Effektoren. Abgebildet sind zwei alternative Wege des Proteinexports: der 2-stufige Weg über Cagβ als Transporter ins Periplasma und von dort in den Kanal, oder ein in einem Schritt über beide bakteriellen Membranen in die Wirtszelle. IM und OM: innere und äußere Membran der Bakterienzelle, PG: Peptidoglykan, CM: Plasmamembran der Wirtszelle.

An dieser Stelle wäre auch eine Wechselwirkung oder Vermittlung des Translokationsfaktors CagZ denkbar, da dieser, wie von Busler *et al.* gezeigt, sowohl mit CagF als auch mit dem Kopplungsprotein Cagβ interagiert (41). Danach könnte die Translokation über die innere Membran durch Cagβ als Transporter erfolgen. In Typ IV-Systemen ist die funktionelle Verbindung zwischen dem periplasmatischen Teil des Kopplungsproteins und den membranüberbrückenden Mpf-Komponenten unklar. Direkte Interaktionen wurden zwar postuliert, aber bisher noch nicht biochemisch bewiesen (43,106).

Die gezeigte Interaktion von CagA mit dem periplasmatischen Bereich des Kanalproteins CagY (*repeat region 2*, RR2) könnte dann einen der nächsten Schritte im Translokationsprozess darstellen und die Einführung von CagA in den Kanal bewirken. Hierbei ist auch eine Beteiligung des periplasmatischen Proteins CagI wahrscheinlich, welches einen der vier Translokationsfaktoren, neben CagF, Cag $\beta$  und CagZ, repräsentiert und, allerdings nur schwach, mit Cag $\beta$  wechselwirkt (41). Der anschließende Transport von CagA durch den Kanal in die eukaryotische Zelle bedarf vermutlich der Interaktion mit weiteren Proteinen, ist aber bisher nicht ansatzweise aufgeklärt worden. Ebenso wenig ist ein möglicher Rezeptor für das T4SS auf der Oberfläche der Wirtszelle bekannt.

Auch die Frage nach Proteinen, die, analog zu den so genannten Translokatoren in T3SS (159), durch Insertion in die Wirtszellmembran eine Pore generieren könnten, ist noch nicht geklärt. Nach erfolgreichem Transport wären die *coiled-coil* Bereiche des CagA-Moleküls ein interessantes Motiv für Interaktionen. Viele eukaryotische Proteine, die an der Regulation einiger von CagA modulierten Wirtszellfunktionen beteiligt sind, weisen ebenfalls *coiled-coil* Bereiche auf. Dies trifft z. B. auf einige *tight-junction* Proteine (Occludin, Cingulin) zu und einige Aktin-assoziierte Proteine wie Cortactin und  $\alpha$ -Catenin. Cortactin wird abhängig von einer CagA-Phosphorylierung dephosphoryliert (211). Des Weiteren höchst interessant ist die Frage nach dem die Translokation initiiierenden Moment, bzw. dem molekularen Auslöser. Höchstwahrscheinlich ist hier die Interaktion von *H. pylori* mit der Zielzelle entscheidend. Dabei könnten durch Rezeptor-Ligand-Interaktion induzierte Signale oder das Sensieren von niedrigen Ionenkonzentrationen z. B. über EF-Hand Motive des Proteins Cag $\beta$  eine Rolle spielen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Effektorprotein CagA, trotz gemeinsamer Merkmale mit anderen Typ IV-Substraten (C-terminale Signalsequenz) einige weitere Charakteristika aufweist, die bisher einzigartig in T4SS sind. Dazu gehören das N-terminale Sekretionssignal sowie die Bindedomäne des CagF-Dimers, die notwendig ist für die Rekrutierung zum Sekretionsapparat.

## V Zusammenfassung

Die *Helicobacter pylori*-Infektion stellt eine der häufigsten bakteriellen Infektionen weltweit dar und wird mit einem erhöhten Risiko für Krankheiten von Gastritis bis zum Adenokarzinom des Magens assoziiert. Während auch Faktoren wie Ernährungsweise und genetische Prädisposition des menschlichen Wirtes eine Rolle spielen, korreliert die Schwere der Erkrankung stark mit den Virulenzfaktoren des infizierenden *H. pylori*-Stammes. So genannte Typ I-Stämme enthalten unter anderem die *cag*-Pathogenitätsinsel (*cag*-PAI), die für ein Typ IV-Sekretionssystem und dessen Substrat CagA codiert. CagA wird in Wirtszellen sekretiert und führt dort zu zahlreichen Veränderungen in der Signaltransduktion und zu Rearrangements des Aktincytoskeletts. Veränderungen, die direkt mit der Pathogenese in Verbindung stehen.

Um die Signalbereiche, die für die Translokation des CagA-Moleküls notwendig sind näher charakterisieren zu können, wurde zunächst ein neues Testsystem etabliert. Mit Hilfe des 13 Aminosäuren langen GSK-Tags war es möglich, die Translokation von CagA unabhängig von einer Tyrosinphosphorylierung in einer Vielzahl von eukaryotischen Zellen nachzuweisen. Der GSK-Tag wird im Cytoplasma der Wirtszelle phosphoryliert und kann mit kommerziell erhältlichen Antikörpern (anti-GSK, anti-P-GSK) detektiert werden. Mit Hilfe dieses Testsystems wurden CagA-Varianten mit N-terminalen, C-terminalen und internen Deletionen auf Translokation überprüft. Es konnte gezeigt werden, dass die 12 C-terminalen Aminosäuren für die Translokation des Moleküls notwendig sind. Obwohl in diesem Bereich einige positiv geladene Aminosäuren vorkommen, sind diese nicht notwendig für die Signalerkennung, scheinen jedoch einen Einfluss auf die Effizienz zu haben.



Auch der N-Terminus des CagA-Proteins ist essentiell für die Translokation. Eine mögliche Erklärung für die Beteiligung beider Termini wäre, dass die Substraterkennung eher ein konformationelles als ein lineares Signal erfordert. Als Alternative erscheint ein 2-stufiger Translokationsprozess eher wahrscheinlich. In diesem Modell würden die Sekretion ins Periplasma ein C-terminales Signal und der weitere Transport in die Zielzelle die Erkennung des N-Terminus voraussetzen. Weiterhin wurde gezeigt, dass die Deletion des mittleren Molekülbereichs (Aminosäuren 695 bis 1019), einschließlich der EPIYA-Motive, die CagA-Translokation nicht beeinträchtigt. Dieser Teil des Proteins ist anscheinend nicht notwendig für die Substraterkennung, aber für die Funktion des Effektors in der Wirtszelle. In diesen Zusammenhang konnte ferner dargestellt werden, dass die EPIYA-Region des CagA-Moleküls für die Membranrekrutierung zwar notwendig aber nicht ausreichend ist. Eine phosphorylierbare EPIYA-Region ist ebenfalls für die Induktion des *hummingbird*-Phänotyps erforderlich nicht jedoch für die Prozessierung von CagA in Makrophagen und dendritischen Zellen. Weitere translozierte Effektorproteine konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden.

Im Cag-T4SS sind 18 Proteine notwendig für die CagA-Translokation. Von diesen sind jedoch nur 14 am Aufbau des Sekretionsapparates beteiligt. Bei den vier zusätzlichen so genannten Translokationsfaktoren handelt es sich unter anderem um das Kopplungsprotein Cag $\beta$  (HP524) und das CagF-Protein (HP543). Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass CagF direkt und unabhängig von anderen Faktoren mit CagA interagiert. Lokalisiert ist CagF höchstwahrscheinlich sowohl im Cytoplasma als auch an der inneren Membran. Die Assoziation mit der Cytoplasmamembran ist peripher und funktioniert wahrscheinlich über einen stark hydrophoben Bereich in der Mitte des CagF-Proteins. CagF agiert als Sekretions-Chaperon und bindet an eine Domäne direkt stromaufwärts des C-terminalen Translokationssignals an das CagA-Molekül.

Aus Gelfiltrationsexperimenten kann geschlossen werden, dass CagF als Dimer vorliegt und mit CagA einen 2:1 Komplex bildet. Diese Stöchiometrie liegt auch bei vielen Chaperonen in T3SS vor. Da sich CagA-Varianten mit Deletionen von 20, 54 oder 92 C-terminalen Aminosäuren als translokationsinkompetent erwiesen haben, aber mit CagF interagieren, ist es unwahrscheinlich, dass CagF als „Signalerkennungsprotein“ für CagA fungiert. Möglicherweise erfolgt dieser Schritt durch das Kopplungsprotein Cag $\beta$ , dessen Interaktion mit CagA ebenfalls gezeigt wurde. Die beteiligten Domänen sind noch nicht bekannt. Zusammengefasst, scheint die CagF-Bindung der erste Schritt in der CagA-Translokation zu sein, gefolgt von der Erkennung der Signalsequenz, wahrscheinlich durch Cag $\beta$ . Die CagF-Bindung könnte die Zugänglichkeit des C-terminalen Sekretionssignals für die Substraterkennung verbessern oder auch den C-Terminus teilweise entfalten.

## VI Summary

*Helicobacter pylori* colonizes the human stomach of almost half of the world's population and is associated with an increased risk for diseases ranging from gastritis to peptic ulcer and gastric cancer. While some aspects of infection outcome are related to diet and host genetic factors, there is a strong correlation of more severe pathology and infection with so-called type I *H. pylori* strains, strains harbouring the cytotoxin-associated gene pathogenicity island (*cag* PAI). This 37 kb genomic region encodes a type IV secretion system (T4SS) and its substrate CagA. Via type IV secretion the effector protein CagA is delivered into host cells, where it is responsible for multiple changes in host cell signalling and cytoskeletal rearrangements, which are thought to contribute directly to disease.

To investigate the protein signals required to inject the CagA molecule, an assay to measure this translocation is required. We were able to establish a translocation assay based on the construction of a gene fusion that encodes a hybrid protein of a 13-residue tag derived from human glycogen synthase kinase 3 $\beta$  (GSK) and the effector protein. This GSK tag can be phosphorylated in the cytoplasm of different target cells and is thus a valuable tool to monitor protein translocation by use of commercial antibodies (anti-GSK, anti-PGSK). Using the GSK tag it was possible to determine the translocation of CagA variants with N-terminal, C-terminal and internal deletions. We were able to show that CagA translocation depends on the presence of its 12 C-terminal amino acids, containing an array of positively charged residues. Interestingly, these positive residues are not necessary for CagA translocation.

Removal of the N-terminal part of the CagA protein renders the protein translocation-incompetent as well. One possible explanation for the requirement of both termini would be the presence of a conformational rather than a linear signal for CagA recognition. An alternative, and indeed more convincing, explanation would be a two-step translocation process, as suggested for other type IV secretion systems. Furthermore, it has been shown that deletion of the protein mid region (amino acids 695 to 1019), containing the EPIYA motifs, does not interfere with the CagA translocation process. This part of the CagA molecule is therefore not necessary for substrate recognition, but instead for CagA function inside the eukaryotic cell. In this context, we were able to show that the EPIYA-containing region is necessary but not sufficient for membrane recruitment of CagA in the host cell. In contrast, a phosphorylatable EPIYA region is crucial for induction of the hummingbird phenotype, whereas it is dispensable for CagA processing in macrophages and dendritic cells.

We were not able to demonstrate translocation of further putative effector proteins, raising the question whether CagA is indeed the only protein substrate of *H. pylori*'s Cag Type IV secretion system.

The Cag type IV secretion system contains 18 gene products that are essential for CagA translocation. However, only 14 proteins are thought to build up the complex machinery of the secretion apparatus. The four additional, so-called translocation factors are necessary for CagA translocation without being apparatus components. These include the coupling protein homolog Cag $\beta$  (HP524) and the CagF (HP543) protein. We were able to show that CagF interacts directly and independently of other PAI-encoded proteins with CagA. Fractionation experiments demonstrate that CagF is most likely localized in the cytoplasm and at the cytoplasmic face of the inner membrane. This association with the cytoplasmic membrane is of peripheral nature and works probably through a hydrophobic patch in the CagF mid region. CagF functions as a secretion chaperone, binding to a region near the C-terminus of the effector protein CagA and thus adjacent to its C-terminal translocation signal.

Gel filtration experiments are consistent with a dimerization of CagF alone and the formation of a 2:1 complex with CagA, which is similar to the behaviour of secretion chaperones in type III secretion systems. Since CagA variants lacking 20, 54 or 92 C-terminal amino acids are translocation-incompetent, but still able to interact with CagF, it is unlikely that CagF itself is the signal recognition protein for CagA. We suggest that this function is conducted by the coupling protein Cag $\beta$ , which was shown to interact with CagA as well. The interacting domains remain to be elucidated. Taken together, CagF binding seems to be the first step in the process of CagA translocation and thus precedes recognition of the translocation signal, probably by Cag $\beta$ . CagF binding may increase the accessibility of the C-terminal secretion signal for the signal recognition factor or may keep the C-terminus partially unfolded.

## VII Literaturverzeichnis

1. 1993. Epidemiology of, and risk factors for, *Helicobacter pylori* infection among 3194 asymptomatic subjects in 17 populations. The EUROGAST Study Group. *Gut* **34**:1672-1676.
2. 2007. [www.urbanfischer.de/](http://www.urbanfischer.de/)
3. 2005. [http://nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/2005/index.html](http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2005/index.html)
4. 2006. <http://myhits.isb-sib.ch/>
5. 2006. Coiled-coil domains prediction, <http://www.ch.embnet.org/>
6. 2007. TMPred, [http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html)
7. **Akeda, Y. and J. E. Galan.** 2005. Chaperone release and unfolding of substrates in type III secretion. *Nature* **437**:911-915.
8. **Alm, R. A., L. S. Ling, D. T. Moir, B. L. King, E. D. Brown, P. C. Doig, D. R. Smith, B. Noonan, B. C. Guild, B. L. deJonge, G. Carmel, P. J. Tummino, A. Caruso, M. Uria-Nickelsen, D. M. Mills, C. Ives, R. Gibson, D. Merberg, S. D. Mills, Q. Jiang, D. E. Taylor, G. F. Vovis, and T. J. Trust.** 1999. Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* **397**:176-180.
9. **Amieva, M. R., R. Vogelmann, A. Covacci, L. S. Tompkins, W. J. Nelson, and S. Falkow.** 2003. Disruption of the epithelial apical-junctional complex by *Helicobacter pylori* CagA. *Science* **300**:1430-1434.
10. **Amor, J. C., J. Swails, X. Zhu, C. R. Roy, H. Nagai, A. Ingmundson, X. Cheng, and R. A. Kahn.** 2005. The structure of RalF, an ADP-ribosylation factor guanine nucleotide exchange factor from *Legionella pneumophila*, reveals the presence of a cap over the active site. *J Biol. Chem.* **280**:1392-1400.
11. **Andjelkovic, M., T. Jakubowicz, P. Cron, X. F. Ming, J. W. Han, and B. A. Hemmings.** 1996. Activation and phosphorylation of a pleckstrin homology domain containing protein kinase (RAC-PK/PKB) promoted by serum and protein phosphatase inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**:5699-5704.

12. **Aras, R. A., W. Fischer, G. I. Perez-Perez, M. Crosatti, T. Ando, R. Haas, and M. J. Blaser.** 2003. Plasticity of repetitive DNA sequences within a bacterial (Type IV) secretion system component. *J. Exp. Med.* **198**:1349-1360.
13. **Atmakuri, K., Z. Ding, and P. J. Christie.** 2003. VirE2, a type IV secretion substrate, interacts with the VirD4 transfer protein at cell poles of *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol. Microbiol* **49**:1699-1713.
14. **Azuma, T., A. Yamakawa, S. Yamazaki, M. Ohtani, Y. Ito, A. Muramatsu, H. Suto, Y. Yamazaki, Y. Keida, H. Higashi, and M. Hatakeyama.** 2004. Distinct diversity of the *cag* pathogenicity island among *Helicobacter pylori* strains in Japan. *J Clin Microbiol* **42**:2508-2517.
15. **Backert, S., T. Kwok, and W. Konig.** 2005. Conjugative plasmid DNA transfer in *Helicobacter pylori* mediated by chromosomally encoded relaxase and TraG-like proteins. *Microbiology* **151**:3493-3503.
16. **Backert, S. and T. F. Meyer.** 2006. Type IV secretion systems and their effectors in bacterial pathogenesis. *Curr. Opin. Microbiol* **9**:207-217.
17. **Backert, S., E. C. Muller, P. R. Jungblut, and T. F. Meyer.** 2001. Tyrosine phosphorylation patterns and size modification of the *Helicobacter pylori* CagA protein after translocation into gastric epithelial cells. *Proteomics*. **1**:608-617.
18. **Backert, S., T. Schwarz, S. Miehlke, C. Kirsch, C. Sommer, T. Kwok, M. Gerhard, U. B. Goebel, N. Lehn, W. Koenig, and T. F. Meyer.** 2004. Functional analysis of the *cag* pathogenicity island in *Helicobacter pylori* isolates from patients with gastritis, peptic ulcer, and gastric cancer. *Infect Immun.* **72**:1043-1056.
19. **Bagnoli, F., L. Buti, L. Tompkins, A. Covacci, and M. R. Amieva.** 2005. *Helicobacter pylori* CagA induces a transition from polarized to invasive phenotypes in MDCK cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S A* **102**:16339-16344.
20. **Bamford, K. B., J. Bickley, J. S. Collins, B. T. Johnston, S. Potts, V. Boston, R. J. Owen, and J. M. Sloan.** 1993. *Helicobacter pylori*: comparison of DNA fingerprints provides evidence for intrafamilial infection. *Gut* **34**:1348-1350.
21. **Bamford, K. B., X. Fan, S. E. Crowe, J. F. Leary, W. K. Gourley, G. K. Luthra, E. G. Brooks, D. Y. Graham, V. E. Reyes, and P. B. Ernst.** 1998. Lymphocytes in the human gastric mucosa during *Helicobacter pylori* have a T helper cell 1 phenotype. *Gastroenterology* **114**:482-492.
22. **Bauer, B., S. Moese, S. Bartfeld, T. F. Meyer, and M. Selbach.** 2005. Analysis of cell type-specific responses mediated by the type IV secretion system of *Helicobacter pylori*. *Infect Immun.* **73**:4643-4652.
23. **Bennett, J. C. and C. Hughes.** 2000. From flagellum assembly to virulence: the extended family of type III export chaperones. *Trends Microbiol.* **8**:202-204.
24. **Berks, B. C., F. Sargent, and T. Palmer.** 2000. The Tat protein export pathway. *Mol. Microbiol* **35**:260-274.

25. **Bik, E. M., P. B. Eckburg, S. R. Gill, K. E. Nelson, E. A. Purdom, F. Francois, G. Perez-Perez, M. J. Blaser, and D. A. Relman.** 2006. Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **103**:732-737.
26. **Binet, R., S. Letoffe, J. M. Ghigo, P. Delepelaire, and C. Wandersman.** 1997. Protein secretion by Gram-negative bacterial ABC exporters--a review. *Gene* **192**:7-11.
27. **Birtalan, S. C., R. M. Phillips, and P. Ghosh.** 2002. Three-dimensional secretion signals in chaperone-effector complexes of bacterial pathogens. *Mol. Cell* **9**:971-980.
28. **Bjorkholm, B., A. Lundin, A. Sillen, K. Guillemin, N. Salama, C. Rubio, J. I. Gordon, P. Falk, and L. Engstrand.** 2001. Comparison of genetic divergence and fitness between two subclones of *Helicobacter pylori*. *Infect Immun.* **69**:7832-7838.
29. **Blaser, M. J.** 1999. Where does *Helicobacter pylori* come from and why is it going away? *JAMA* **282**:2260-2262.
30. **Blomstergren, A., A. Lundin, C. Nilsson, L. Engstrand, and J. Lundeberg.** 2004. Comparative analysis of the complete cag pathogenicity island sequence in four *Helicobacter pylori* isolates. *Gene* **328**:85-93.
31. **Blum, H., H. Beier, and H. J. Gross.** 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA, and DNA in polyacrylamid gels. *Electrophoresis* **8**:93-98.
32. **Boonjakuakul, J. K., D. R. Canfield, and J. V. Solnick.** 2005. Comparison of *Helicobacter pylori* virulence gene expression in vitro and in the Rhesus macaque. *Infect Immun.* **73**:4895-4904.
33. **Boonjakuakul, J. K., M. Syvanen, A. Suryaprasad, C. L. Bowlus, and J. V. Solnick.** 2004. Transcription profile of *Helicobacter pylori* in the human stomach reflects its physiology in vivo. *J Infect Dis* **190**:946-956.
34. **Boren, T., P. Falk, K. A. Roth, G. Larson, and S. Normark.** 1993. Attachment of *Helicobacter pylori* to human gastric epithelium mediated by blood group antigens. *Science* **262**:1892-1895.
35. **Boyd, A. P., I. Lambermont, and G. R. Cornelis.** 2000. Competition between the Yops of *Yersinia enterocolitica* for delivery into eukaryotic cells: role of the SycE chaperone binding domain of YopE. *J. Bacteriol.* **182**:4811-4821.
36. **Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-254.
37. **Briones, G., D. Hofreuter, and J. E. Galan.** 2006. Cre reporter system to monitor the translocation of type III secreted proteins into host cells. *Infect. Immun.* **74**:1084-1090.
38. **Buhrdorf, R.** 2004. Genetische und biochemische Untersuchungen zum Aufbau und zur Funktion des Cag Typ IV-Sekretionssystems von *Helicobacter pylori*. Dr. rer. nat Technische Universität München.
39. **Burns, D. L.** 1999. Biochemistry of type IV secretion. *Curr. Opin. Microbiol* **2**:25-29.



40. **Burns, D. L., S. Fiddner, A. M. Cheung, and A. Verma.** 2004. Analysis of subassemblies of pertussis toxin subunits in vivo and their interaction with the *ptl* transport apparatus. *Infect Immun.* **72**:5365-5372.
41. **Busler, V. J., V. J. Torres, M. S. McClain, O. Tirado, D. B. Friedman, and T. L. Cover.** 2006. Protein-protein interactions among *Helicobacter pylori* *cag* proteins. *J Bacteriol.* **188**:4787-4800.
42. **Buttner, C. R., G. R. Cornelis, D. W. Heinz, and H. H. Niemann.** 2005. Crystal structure of *Yersinia enterocolitica* type III secretion chaperone SycT. *Protein Sci.* **14**:1993-2002.
43. **Cabezón, E., J. I. Sastre, and C. F. de la.** 1997. Genetic evidence of a coupling role for the TraG protein family in bacterial conjugation. *Mol. Gen. Genet.* **254**:400-406.
44. **Cambronne, E. D. and C. R. Roy.** 2006. Recognition and delivery of effector proteins into eukaryotic cells by bacterial secretion systems. *Traffic* **7**:929-939.
45. **Cascales, E. and P. J. Christie.** 2003. The versatile bacterial type IV secretion systems. *Nat. Rev. Microbiol.* **1**:137-149.
46. **Censini, S., C. Lange, Z. Xiang, J. E. Crabtree, P. Ghiara, M. Borodovsky, R. Rappuoli, and A. Covacci.** 1996. *cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**:14648-14653.
47. **Charpentier, X. and E. Oswald.** 2004. Identification of the secretion and translocation domain of the enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* effector Cif, using TEM-1 beta-lactamase as a new fluorescence-based reporter. *J. Bacteriol.* **186**:5486-5495.
48. **Chen, J., K. S. de Felipe, M. Clarke, H. Lu, O. R. Anderson, G. Segal, and H. A. Shuman.** 2004. *Legionella* effectors that promote nonlytic release from protozoa. *Science* **303**:1358-1361.
49. **Chen, L., C. M. Li, and E. W. Nester.** 2000. Transferred DNA (T-DNA)-associated proteins of *Agrobacterium tumefaciens* are exported independently of *virB*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**:7545-7550.
50. **Cheng, J., A. Z. Randall, M. J. Sweredoski, and P. Baldi.** 2005. SCRATCH: a protein structure and structural feature prediction server. *Nucleic Acids Res.* **33**:W72-W76.
51. **Cheng, L. W. and O. Schneewind.** 1999. *Yersinia enterocolitica* type III secretion. On the role of SycE in targeting YopE into HeLa cells. *J Biol. Chem.* **274**:22102-22108.
52. **Christie, P. J., K. Atmakuri, V. Krishnamoorthy, S. Jakubowski, and E. Cascales.** 2005. Biogenesis, architecture, and function of bacterial type IV secretion systems. *Annu. Rev. Microbiol* **59**:451-485.
53. **Christie, P. J. and J. P. Vogel.** 2000. Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells. *Trends Microbiol.* **8**:354-360.

54. **Churin, Y., L. Al-Ghoul, O. Kepp, T. F. Meyer, W. Birchmeier, and M. Naumann.** 2003. *Helicobacter pylori* CagA protein targets the c-Met receptor and enhances the motogenic response. *J. Cell Biol.* **161**:249-255.
55. **Clark, J. M. and R. L. Swika.** 1977. Experimental biochemistry. W.H. Freeman and Company, San Francisco.
56. **Cohen, C. and D. A. Parry.** 1990. Alpha-helical coiled coils and bundles: how to design an alpha-helical protein. *Proteins* **7**:1-15.
57. **Cormack, B. P., R. H. Valdivia, and S. Falkow.** 1996. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* **173**:33-38.
58. **Cornelis, G. R. and F. Van Gijsegem.** 2000. Assembly and function of type III secretory systems. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**:735-774.
59. **Couturier, M. R., E. Tasca, C. Montecucco, and M. Stein.** 2006. Interaction with CagF is required for translocation of CagA into the host via the *Helicobacter pylori* type IV secretion system. *Infect Immun.* **74**:273-281.
60. **Covacci, A., S. Censini, M. Bugnoli, R. Petracca, D. Burroni, G. Macchia, A. Massone, E. Papini, Z. Xiang, N. Figura, and .** 1993. Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S A* **90**:5791-5795.
61. **Covacci, A., J. L. Telford, G. Del Giudice, J. Parsonnet, and R. Rappuoli.** 1999. *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science* **284**:1328-1333.
62. **Craanen, M. E., P. Blok, W. Dekker, and G. N. Tytgat.** 1994. *Helicobacter pylori* and early gastric cancer. *Gut* **35**:1372-1374.
63. **Crabtree, J. E., J. I. Wyatt, G. M. Sobala, G. Miller, D. S. Tompkins, J. N. Primrose, and A. G. Morgan.** 1993. Systemic and mucosal humoral responses to *Helicobacter pylori* in gastric cancer. *Gut* **34**:1339-1343.
64. **Crabtree, J. E., J. I. Wyatt, L. K. Trejdosiewicz, P. Peichl, P. H. Nichols, N. Ramsay, J. N. Primrose, and I. J. Lindley.** 1994. Interleukin-8 expression in *Helicobacter pylori* infected, normal, and neoplastic gastroduodenal mucosa. *J Clin Pathol.* **47**:61-66.
65. **Crabtree, J. E., Z. Xiang, I. J. Lindley, D. S. Tompkins, R. Rappuoli, and A. Covacci.** 1995. Induction of interleukin-8 secretion from gastric epithelial cells by a cagA negative isogenic mutant of *Helicobacter pylori*. *J Clin Pathol.* **48**:967-969.
66. **Cryer, D. R., R. Eccleshall, and J. Marmur.** 1975. Isolation of yeast DNA. *Methods Cell Biol.* **12**:39-44.
67. **Dailidiene, D., G. Dailide, K. Ogura, M. Zhang, A. K. Mukhopadhyay, K. A. Eaton, G. Cattoli, J. G. Kusters, and D. E. Berg.** 2004. *Helicobacter acinonychis*: genetic and rodent infection studies of a *Helicobacter pylori*-like gastric pathogen of cheetahs and other big cats. *J Bacteriol.* **186**:356-365.

68. **Day, J. B., F. Ferracci, and G. V. Plano.** 2003. Translocation of YopE and YopN into eukaryotic cells by *Yersinia pestis* yopN, tyeA, sycN, yscB and lcrG deletion mutants measured using a phosphorylatable peptide tag and phosphospecific antibodies. *Mol. Microbiol.* **47**:807-823.
69. **DeBord, K. L., N. S. Galanopoulos, and O. Schneewind.** 2003. The *ttsA* gene is required for low-calcium-induced type III secretion of Yop proteins and virulence of *Yersinia enterocolitica* W22703. *J. Bacteriol.* **185**:3499-3507.
70. **Dehio, C. and M. Meyer.** 1997. Maintenance of broad-host-range incompatibility group P and group Q plasmids and transposition of Tn5 in *Bartonella henselae* following conjugal plasmid transfer from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**:538-540.
71. **Delahay, R. M. and G. Frankel.** 2002. Coiled-coil proteins associated with type III secretion systems: a versatile domain revisited. *Mol. Microbiol.* **45**:905-916.
72. **Deng, W., L. Chen, W. T. Peng, X. Liang, S. Sekiguchi, M. P. Gordon, L. Comai, and E. W. Nester.** 1999. VirE1 is a specific molecular chaperone for the exported single-stranded-DNA-binding protein VirE2 in *Agrobacterium*. *Mol. Microbiol.* **31**:1795-1807.
73. **Dixon, M. F.** 2001. Prospects for intervention in gastric carcinogenesis: reversibility of gastric atrophy and intestinal metaplasia. *Gut* **49**:2-4.
74. **Drumm, B., G. I. Perez-Perez, M. J. Blaser, and P. M. Sherman.** 1990. Intrafamilial clustering of *Helicobacter pylori* infection. *N. Engl. J. Med.* **322**:359-363.
75. **Eaton, K. A., C. L. Brooks, D. R. Morgan, and S. Krakowka.** 1991. Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. *Infect Immun.* **59**:2470-2475.
76. **Eaton, K. A., D. R. Morgan, and S. Krakowka.** 1992. Motility as a factor in the colonisation of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*. *J. Med. Microbiol.* **37**:123-127.
77. **Economou, A., P. J. Christie, R. C. Fernandez, T. Palmer, G. V. Plano, and A. P. Pugsley.** 2006. Secretion by numbers: protein traffic in prokaryotes. *Mol. Microbiol.* **62**:308-319.
78. **Ehrbar, K., B. Winnen, and W. D. Hardt.** 2006. The chaperone binding domain of SopE inhibits transport via flagellar and SPI-1 TTSS in the absence of InvB. *Mol. Microbiol.* **59**:248-264.
79. **El Etr, S. H., A. Mueller, L. S. Tompkins, S. Falkow, and D. S. Merrell.** 2004. Phosphorylation-independent effects of CagA during interaction between *Helicobacter pylori* and T84 polarized monolayers. *J. Infect. Dis.* **190**:1516-1523.
80. **Espinosa, A. and J. R. Alfano.** 2004. Disabling surveillance: bacterial type III secretion system effectors that suppress innate immunity. *Cell Microbiol.* **6**:1027-1040.
81. **Falquet, L., M. Pagni, P. Bucher, N. Hulo, C. J. Sigrist, K. Hofmann, and A. Bairoch.** 2002. The PROSITE database, its status in 2002. *Nucleic Acids Res.* **30**:235-238.

82. **Falush, D., T. Wirth, B. Linz, J. K. Pritchard, M. Stephens, M. Kidd, M. J. Blaser, D. Y. Graham, S. Vacher, G. I. Perez-Perez, Y. Yamaoka, F. Megraud, K. Otto, U. Reichard, E. Katzwitsch, X. Wang, M. Achtman, and S. Suerbaum.** 2003. Traces of human migrations in *Helicobacter pylori* populations. *Science* **299**:1582-1585.
83. **Feldman, M. F. and G. R. Cornelis.** 2003. The multitasking type III chaperones: all you can do with 15 kDa. *FEMS Microbiol Lett* **219**:151-158.
84. **Fetherston, J. D., P. Schuetze, and R. D. Perry.** 1992. Loss of the pigmentation phenotype in *Yersinia pestis* is due to the spontaneous deletion of 102 kb of chromosomal DNA which is flanked by a repetitive element. *Mol. Microbiol* **6**:2693-2704.
85. **Fischer, W., R. Buhrdorf, E. Gerland, and R. Haas.** 2001. Outer membrane targeting of passenger proteins by the vacuolating cytotoxin autotransporter of *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* **69**:6769-6775.
86. **Fischer, W. and R. Haas.** 2004. The RecA protein of *Helicobacter pylori* requires a posttranslational modification for full activity. *J Bacteriol.* **186**:777-784.
87. **Fischer, W., J. Puls, R. Buhrdorf, B. Gebert, S. Odenbreit, and R. Haas.** 2001. Systematic mutagenesis of the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island: essential genes for CagA translocation in host cells and induction of interleukin-8. *Mol. Microbiol.* **42**:1337-1348.
88. **Franco, A. T., D. A. Israel, M. K. Washington, U. Krishna, J. G. Fox, A. B. Rogers, A. S. Neish, L. Collier-Hyams, G. I. Perez-Perez, M. Hatakeyama, R. Whitehead, K. Gaus, D. P. O'Brien, J. Romero-Gallo, and R. M. Peek, Jr.** 2005. Activation of  $\beta$ -catenin by carcinogenic *Helicobacter pylori*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**:10646-10651.
89. **Franke, T. F., S. I. Yang, T. O. Chan, K. Datta, A. Kazlauskas, D. K. Morrison, D. R. Kaplan, and P. N. Tsichlis.** 1995. The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase. *Cell* **81**:727-736.
90. **Galgani, M., I. Busiello, S. Censini, S. Zappacosta, L. Racioppi, and R. Zarrilli.** 2004. *Helicobacter pylori* induces apoptosis of human monocytes but not monocyte-derived dendritic cells: role of the cag pathogenicity island. *Infect Immun.* **72**:4480-4485.
91. **Garcia, J. T., F. Ferracci, M. W. Jackson, S. S. Joseph, I. Pattis, L. R. Plano, W. Fischer, and G. V. Plano.** 2006. Measurement of effector protein injection by type III and type IV secretion systems by using a 13-residue phosphorylatable glycogen synthase kinase tag. *Infect Immun.* **74**:5645-5657.
92. **Gebert, B.** 2004. Die Funktion des vakuolisierenden Cytotoxins (VacA) und die Prozessierung des Cytotoxin-assoziierten Antigens (CagA) von *Helicobacter pylori* in Immunzellen. Dr. rer. nat. Ludwig-Maximilians-Universität München.
93. **Gebert, B., W. Fischer, E. Weiss, R. Hoffmann, and R. Haas.** 2003. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin inhibits T lymphocyte activation. *Science* **301**:1099-1102.
94. **Gerhard, M., N. Lehn, N. Neumayer, T. Boren, R. Rad, W. Schepp, S. Miehke, M. Classen, and C. Prinz.** 1999. Clinical relevance of the *Helicobacter pylori* gene for blood-group antigen-binding adhesin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**:12778-12783.

95. **Ghose, C., G. I. Perez-Perez, M. G. Dominguez-Bello, D. T. Pride, C. M. Bravi, and M. J. Blaser.** 2002. East Asian genotypes of *Helicobacter pylori* strains in Amerindians provide evidence for its ancient human carriage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**:15107-15111.
96. **Ghosh, P.** 2004. Process of protein transport by the type III secretion system. *Microbiol Mol. Biol. Rev.* **68**:771-795.
97. **Gilmour, M. W., J. E. Gunton, T. D. Lawley, and D. E. Taylor.** 2003. Interaction between the IncHI1 plasmid R27 coupling protein and type IV secretion system: TraG associates with the coiled-coil mating pair formation protein TrhB. *Mol. Microbiol.* **49**:105-116.
98. **Gladziwa, U. and U. Klotz.** 1996. Adenylate cyclase of gastric mucosa in patients with chronic renal failure. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* **34**:477-481.
99. **Gomis-Ruth, F. X., G. Moncalian, C. F. de la, and M. Coll.** 2002. Conjugative plasmid protein TrwB, an integral membrane type IV secretion system coupling protein. Detailed structural features and mapping of the active site cleft. *J Biol. Chem.* **277**:7556-7566.
100. **Goodman, K. J. and P. Correa.** 1995. The transmission of *Helicobacter pylori*. A critical review of the evidence. *Int. J Epidemiol.* **24**:875-887.
101. **Goodwin, C. S., W. McConnell, R. K. McCulloch, C. McCullough, R. Hill, M. A. Bronsdon, and G. Kasper.** 1989. Cellular fatty acid composition of *Campylobacter pylori* from primates and ferrets compared with those of other campylobacters. *J Clin Microbiol* **27**:938-943.
102. **Gruenheid, S., I. Sekirov, N. A. Thomas, W. Deng, P. O'Donnell, D. Goode, Y. Li, E. A. Frey, N. F. Brown, P. Metalnikov, T. Pawson, K. Ashman, and B. B. Finlay.** 2004. Identification and characterization of NleA, a non-LEE-encoded type III translocated virulence factor of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Mol. Microbiol.* **51**:1233-1249.
103. **Guillemin, K., N. R. Salama, L. S. Tompkins, and S. Falkow.** 2002. Cag pathogenicity island-specific responses of gastric epithelial cells to *Helicobacter pylori* infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**:15136-15141.
104. **Haas, R., A. F. Kahrs, D. Facius, H. Allmeier, R. Schmitt, and T. F. Meyer.** 1993. TnMax--a versatile mini-transposon for the analysis of cloned genes and shuttle mutagenesis. *Gene* **130**:23-31.
105. **Hacker, J., G. Blum-Oehler, I. Muhldorfer, and H. Tschape.** 1997. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol. Microbiol* **23**:1089-1097.
106. **Hamilton, C. M., H. Lee, P. L. Li, D. M. Cook, K. R. Piper, S. B. von Bodman, E. Lanka, W. Ream, and S. K. Farrand.** 2000. TraG from RP4 and TraG and VirD4 from Ti plasmids confer relaxosome specificity to the conjugal transfer system of pTiC58. *J. Bacteriol.* **182**:1541-1548.
107. **Hanahan, D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol. Biol.* **166**:557-580.

108. **Harry, E. J., K. Pogliano, and R. Losick.** 1995. Use of immunofluorescence to visualize cell-specific gene expression during sporulation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* **177**:3386-3393.
109. **Heesemann, J. and R. Laufs.** 1983. Construction of a mobilizable *Yersinia enterocolitica* virulence plasmid. *J Bacteriol.* **155**:761-767.
110. **Henderson, I. R., F. Navarro-Garcia, M. Desvaux, R. C. Fernandez, and D. a'Aldeen.** 2004. Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol Mol. Biol. Rev.* **68**:692-744.
111. **Heuermann, D. and R. Haas.** 1998. A stable shuttle vector system for efficient genetic complementation of *Helicobacter pylori* strains by transformation and conjugation. *Mol. Gen. Genet.* **257**:519-528.
112. **Higashi, H., A. Nakaya, R. Tsutsumi, K. Yokoyama, Y. Fujii, S. Ishikawa, M. Higuchi, A. Takahashi, Y. Kurashima, Y. Teishikata, S. Tanaka, T. Azuma, and M. Hatakeyama.** 2004. *Helicobacter pylori* CagA induces Ras-independent morphogenetic response through SHP-2 recruitment and activation. *J. Biol. Chem.* **279**:17205-17216.
113. **Higashi, H., R. Tsutsumi, A. Fujita, S. Yamazaki, M. Asaka, T. Azuma, and M. Hatakeyama.** 2002. Biological activity of the *Helicobacter pylori* virulence factor CagA is determined by variation in the tyrosine phosphorylation sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**:14428-14433.
114. **Higashi, H., R. Tsutsumi, S. Muto, T. Sugiyama, T. Azuma, M. Asaka, and M. Hatakeyama.** 2002. SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein. *Science* **295**:683-686.
115. **Higashi, H., K. Yokoyama, Y. Fujii, S. Ren, H. Yuasa, I. Saadat, N. Murata-Kamiya, T. Azuma, and M. Hatakeyama.** 2005. EPIYA motif is a membrane-targeting signal of *Helicobacter pylori* virulence factor CagA in mammalian cells. *J Biol. Chem.* **280**:23130-23137.
116. **Hofreuter, D., A. Karnholz, and R. Haas.** 2003. Topology and membrane interaction of *Helicobacter pylori* ComB proteins involved in natural transformation competence. *Int. J. Med. Microbiol.* **293**:153-165.
117. **Hofreuter, D., S. Odenbreit, and R. Haas.** 2001. Natural transformation competence in *Helicobacter pylori* is mediated by the basic components of a type IV secretion system. *Mol. Microbiol* **41**:379-391.
118. **Hohlfeld, S., I. Pattis, J. Puls, G. V. Plano, R. Haas, and W. Fischer.** 2006. A C-terminal translocation signal is necessary, but not sufficient for type IV secretion of the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Mol. Microbiol* **59**:1624-1637.
119. **Holmes, D. S. and M. Quigley.** 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* **114**:193-197.
120. **Hu, L. T. and H. L. Mobley.** 1990. Purification and N-terminal analysis of urease from *Helicobacter pylori*. *Infect Immun.* **58**:992-998.

121. **Hubber, A., A. C. Vergunst, J. T. Sullivan, P. J. Hooykaas, and C. W. Ronson.** 2004. Symbiotic phenotypes and translocated effector proteins of the *Mesorhizobium loti* strain R7A VirB/D4 type IV secretion system. *Mol. Microbiol.* **54**:561-574.
122. **Ilver, D., A. Arnqvist, J. Ogren, I. M. Frick, D. Kersulyte, E. T. Incecik, D. E. Berg, A. Covacci, L. Engstrand, and T. Boren.** 1998. Helicobacter pylori adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. *Science* **279**:373-377.
123. **Jakubowski, S. J., E. Cascales, V. Krishnamoorthy, and P. J. Christie.** 2005. Agrobacterium tumefaciens VirB9, an outer-membrane-associated component of a type IV secretion system, regulates substrate selection and T-pilus biogenesis. *J Bacteriol.* **187**:3486-3495.
124. **Judd, P. K., R. B. Kumar, and A. Das.** 2005. The type IV secretion apparatus protein VirB6 of Agrobacterium tumefaciens localizes to a cell pole. *Mol. Microbiol* **55**:115-124.
125. **Kall, L., A. Krogh, and E. L. Sonnhammer.** 2004. A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method. *J. Mol. Biol.* **338**:1027-1036.
126. **Konjetzny, G. E.** 1930. Die entzündliche Grundlage der typischen Geschwürsbildung im Magen und Duodenum. *Ergeb. inn. Med. Kinderheilk.* **37**:184-332.
127. **Konjetzny, G. E.** 1923. Chronische Gastritis und Duodenitis als Ursache des Magenduodenal-geschwürs. *Beitr. pathol. Anat. allg. Pathol.* **71**:618.
128. **Krienitz, W.** 1906. Über das Auftreten von Spirochäten verschiedener Form im Mageninhalt bei *carcinoma ventriculi*. *Dtsch. Med. Wochenschr.* **22**:872.
129. **Kujat Choy, S. L., E. C. Boyle, O. Gal-Mor, D. L. Goode, Y. Valdez, B. A. Vallance, and B. B. Finlay.** 2004. SseK1 and SseK2 are novel translocated proteins of Salmonella enterica serovar typhimurium. *Infect. Immun.* **72**:5115-5125.
130. **Kumar, R. B. and A. Das.** 2002. Polar location and functional domains of the Agrobacterium tumefaciens DNA transfer protein VirD4. *Mol. Microbiol* **43**:1523-1532.
131. **Lai, E. M., O. Chesnokova, L. M. Banta, and C. I. Kado.** 2000. Genetic and environmental factors affecting T-pilin export and T-pilus biogenesis in relation to flagellation of Agrobacterium tumefaciens. *J Bacteriol.* **182**:3705-3716.
132. **Lambert, J. R., S. K. Lin, W. Sievert, L. Nicholson, M. Schembri, and C. Guest.** 1995. High prevalence of Helicobacter pylori antibodies in an institutionalized population: evidence for person-to-person transmission. *Am. J Gastroenterol.* **90**:2167-2171.
133. **Lawley, T. D., W. A. Klimke, M. J. Gubbins, and L. S. Frost.** 2003. F factor conjugation is a true type IV secretion system. *FEMS Microbiol Lett.* **224**:1-15.
134. **Lee, A., J. Fox, and S. Hazell.** 1993. Pathogenicity of Helicobacter pylori: a perspective. *Infect Immun.* **61**:1601-1610.
135. **Lee, S. H. and J. E. Galan.** 2004. Salmonella type III secretion-associated chaperones confer secretion-pathway specificity. *Mol. Microbiol* **51**:483-495.

136. **Letzelter, M., I. Sorg, L. J. Mota, S. Meyer, J. Stalder, M. Feldman, M. Kuhn, I. Callebaut, and G. R. Cornelis.** 2006. The discovery of SycO highlights a new function for type III secretion effector chaperones. *EMBO J* **25**:3223-3233.
137. **Leying, H., S. Suerbaum, G. Geis, and R. Haas.** 1992. Cloning and genetic characterization of a *Helicobacter pylori* flagellin gene. *Mol. Microbiol* **6**:2863-2874.
138. **Liu, G., T. K. McDaniel, S. Falkow, and S. Karlin.** 1999. Sequence anomalies in the Cag7 gene of the *Helicobacter pylori* pathogenicity island. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**:7011-7016.
139. **Llosa, M., F. X. Gomis-Ruth, M. Coll, and F. F. de la Cruz.** 2002. Bacterial conjugation: a two-step mechanism for DNA transport. *Mol. Microbiol* **45**:1-8.
140. **Llosa, M., S. Zunzunegui, and C. F. de la.** 2003. Conjugative coupling proteins interact with cognate and heterologous VirB10-like proteins while exhibiting specificity for cognate relaxosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**:10465-10470.
141. **Logan, R. P.** 1994. *Helicobacter pylori* and gastric cancer. *Lancet* **344**:1078-1079.
142. **Lupas, A.** 1996. Prediction and analysis of coiled-coil structures. *Methods Enzymol.* **266**:513-525.
143. **Malaty, H. M., D. G. Evans, D. J. Evans, Jr., and D. Y. Graham.** 1992. *Helicobacter pylori* in Hispanics: comparison with blacks and whites of similar age and socioeconomic class. *Gastroenterology* **103**:813-816.
144. **Malaty, H. M. and D. Y. Graham.** 1994. Importance of childhood socioeconomic status on the current prevalence of *Helicobacter pylori* infection. *Gut* **35**:742-745.
145. **Marketon, M. M., R. W. DePaolo, K. L. DeBord, B. Jabri, and O. Schneewind.** 2005. Plague bacteria target immune cells during infection. *Science* **309**:1739-1741.
146. **Marlovits, T. C., T. Kubori, A. Sukhan, D. R. Thomas, J. E. Galan, and V. M. Unger.** 2004. Structural insights into the assembly of the type III secretion needle complex. *Science* **306**:1040-1042.
147. **Marmur, J.** 1961. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms, *In* .
148. **Marshall, B. J., J. A. Armstrong, D. B. McGeachie, and R. J. Glancy.** 1985. Attempt to fulfil Koch's postulates for pyloric *Campylobacter*. *Med. J. Aust.* **142**:436-439.
149. **Marshall, B. J. and J. R. Warren.** 1984. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* **1**:1311-1315.
150. **Marshall, T. and K. M. Williams.** 1992. Coomassie blue protein dye-binding assays measure formation of an insoluble protein-dye complex. *Anal. Biochem.* **204**:107-109.
151. **Mattsson, A., A. Tinnert, A. Hamlet, H. Lonroth, I. Bolin, and A. M. Svennerholm.** 1998. Specific antibodies in sera and gastric aspirates of symptomatic and asymptomatic *Helicobacter pylori*-infected subjects. *Clin Diagn. Lab Immunol.* **5**:288-293.



152. McNulty, S. L., B. M. Mole, D. Dailidienė, I. Segal, R. Ally, R. Mistry, O. Secka, R. A. Adegbola, J. E. Thomas, E. M. Lenarcic, R. M. Peek, Jr., D. E. Berg, and M. H. Forsyth. 2004. Novel 180- and 480-base-pair insertions in African and African-American strains of *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol* **42**:5658-5663.
153. Mimuro, H., T. Suzuki, J. Tanaka, M. Asahi, R. Haas, and C. Sasakawa. 2002. Grb2 is a key mediator of *Helicobacter pylori* CagA protein activities. *Mol. Cell* **10**:745-755.
154. Mitchell, H. M., T. Bohane, R. A. Hawkes, and A. Lee. 1993. *Helicobacter pylori* infection within families. *Zentralbl. Bakteriол.* **280**:128-136.
155. Moese, S., M. Selbach, U. Zimny-Arndt, P. R. Jungblut, T. F. Meyer, and S. Backert. 2001. Identification of a tyrosine-phosphorylated 35 kDa carboxy-terminal fragment (p35CagA) of the *Helicobacter pylori* CagA protein in phagocytic cells: processing or breakage? *Proteomics* **1**:618-629.
156. Nagai, H., E. D. Cambronne, J. C. Kagan, J. C. Amor, R. A. Kahn, and C. R. Roy. 2005. A C-terminal translocation signal required for Dot/Icm-dependent delivery of the *Legionella* RalF protein to host cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S A* **102**:826-831.
157. Nagai, H. and C. R. Roy. 2001. The DotA protein from *Legionella pneumophila* is secreted by a novel process that requires the Dot/Icm transporter. *EMBO J* **20**:5962-5970.
158. Naito, M., T. Yamazaki, R. Tsutsumi, H. Higashi, K. Onoe, S. Yamazaki, T. Azuma, and M. Hatakeyama. 2006. Influence of EPIYA-repeat polymorphism on the phosphorylation-dependent biological activity of *Helicobacter pylori* CagA. *Gastroenterology* **130**:1181-1190.
159. Neyt, C. and G. R. Cornelis. 1999. Insertion of a Yop translocation pore into the macrophage plasma membrane by *Yersinia enterocolitica*: requirement for translocators YopB and YopD, but not LcrG. *Mol. Microbiol* **33**:971-981.
160. Nikaido, H. 1994. Isolation of outer membranes. *Methods Enzymol.* **235**:225-234.
161. Nomura, A. and G. N. Stemmermann. 1993. *Helicobacter pylori* and gastric cancer. *J Gastroenterol Hepatol* **8**:294-303.
162. Obert, S., R. J. O'Connor, S. Schmid, and P. Hearing. 1994. The adenovirus E4-6/7 protein transactivates the E2 promoter by inducing dimerization of a heteromeric E2F complex. *Mol. Cell Biol.* **14**:1333-1346.
163. Odenbreit, S., B. Gebert, J. Puls, W. Fischer, and R. Haas. 2001. Interaction of *Helicobacter pylori* with professional phagocytes: role of the cag pathogenicity island and translocation, phosphorylation and processing of CagA. *Cell Microbiol.* **3**:21-31.
164. Odenbreit, S., J. Puls, B. Sedlmaier, E. Gerland, W. Fischer, and R. Haas. 2000. Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. *Science* **287**:1497-1500.
165. Odenbreit, S., M. Till, D. Hofreuter, G. Faller, and R. Haas. 1999. Genetic and functional characterization of the alpAB gene locus essential for the adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric tissue. *Mol. Microbiol* **31**:1537-1548.

166. **Ogura, K., S. Maeda, M. Nakao, T. Watanabe, M. Tada, T. Kyutoku, H. Yoshida, Y. Shiratori, and M. Omata.** 2000. Virulence factors of *Helicobacter pylori* responsible for gastric diseases in Mongolian gerbil. *J Exp. Med* **192**:1601-1610.
167. **Ohata, H., S. Kitauchi, N. Yoshimura, K. Mugitani, M. Iwane, H. Nakamura, A. Yoshikawa, K. Yanaoka, K. Arie, H. Tamai, Y. Shimizu, T. Takeshita, O. Mohara, and M. Ichinose.** 2004. Progression of chronic atrophic gastritis associated with *Helicobacter pylori* infection increases risk of gastric cancer. *Int. J. Cancer* **109**:138-143.
168. **Ormo, M., A. B. Cubitt, K. Kallio, L. A. Gross, R. Y. Tsien, and S. J. Remington.** 1996. Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science* **273**:1392-1395.
169. **Ota, H., T. Katsuyama, S. Nakajima, H. El-Zimaity, J. G. Kim, D. Y. Graham, and R. M. Genta.** 1998. Intestinal metaplasia with adherent *Helicobacter pylori*: a hybrid epithelium with both gastric and intestinal features. *Hum. Pathol.* **29**:846-850.
170. **Ota, H., J. Nakayama, M. Momose, M. Hayama, T. Akamatsu, T. Katsuyama, D. Y. Graham, and R. M. Genta.** 1998. *Helicobacter pylori* infection produces reversible glycosylation changes to gastric mucins. *Virchows Arch.* **433**:419-426.
171. **Oyarzabal, O. A., R. Rad, and S. Backert.** 2007. Conjugative Transfer of Chromosomally Encoded Antibiotic Resistance from *Helicobacter pylori* to *Campylobacter jejuni*. *J. Clin. Microbiol.* **45**:402-408.
172. **Page, A. L. and C. Parsot.** 2002. Chaperones of the type III secretion pathway: jacks of all trades. *Mol. Microbiol.* **46**:1-11.
173. **Pallen, M. J., G. Dougan, and G. Frankel.** 1997. Coiled-coil domains in proteins secreted by type III secretion systems. *Mol. Microbiol.* **25**:423-425.
174. **Palomaki, T., R. Pickersgill, R. Riekk, M. Romantschuk, and H. T. Saarilahti.** 2002. A putative three-dimensional targeting motif of polygalacturonase (PehA), a protein secreted through the type II (GSP) pathway in *Erwinia carotovora*. *Mol. Microbiol* **43**:585-596.
175. **Pantoja, M., L. Chen, Y. Chen, and E. W. Nester.** 2002. *Agrobacterium* type IV secretion is a two-step process in which export substrates associate with the virulence protein VirJ in the periplasm. *Mol. Microbiol* **45**:1325-1335.
176. **Pap, M. and G. M. Cooper.** 1998. Role of glycogen synthase kinase-3 in the phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt cell survival pathway. *J. Biol. Chem.* **273**:19929-19932.
177. **Papatheodorou, P., G. Domanska, M. Oxle, J. Mathieu, O. Selchow, B. Kenny, and J. Rassow.** 2006. The enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Map effector is imported into the mitochondrial matrix by the TOM/Hsp70 system and alters organelle morphology. *Cell Microbiol.* **8**:677-689.
178. **Parsonnet, J., S. Hansen, L. Rodriguez, A. B. Gelb, R. A. Warnke, E. Jellum, N. Orentreich, J. H. Vogelstein, and G. D. Friedman.** 1994. *Helicobacter pylori* infection and gastric lymphoma. *N. Engl. J Med* **330**:1267-1271.
179. **Peek, R. M., Jr.** 2002. *Helicobacter pylori* strain-specific modulation of gastric mucosal cellular turnover: implications for carcinogenesis. *J Gastroenterol* **37 Suppl 13**:10-16.

180. **Phadnis, S. H., M. H. Parlow, M. Levy, D. Ilver, C. M. Caulkins, J. B. Connors, and B. E. Dunn.** 1996. Surface localization of *Helicobacter pylori* urease and a heat shock protein homolog requires bacterial autolysis. *Infect Immun.* **64**:905-912.
181. **Phan, J., J. E. Tropea, and D. S. Waugh.** 2004. Structure of the *Yersinia pestis* type III secretion chaperone SycH in complex with a stable fragment of YscM2. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **60**:1591-1599.
182. **Poehling, H. M. and V. Neuhof.** 1981. Visualization of proteins with a silver "stain": a critical analysis. *Electrophoresis* **2**:141-147.
183. **Prinz, C., M. Schoniger, R. Rad, I. Becker, E. Keiditsch, S. Wagenpfeil, M. Classen, T. Rosch, W. Schepp, and M. Gerhard.** 2001. Key importance of the *Helicobacter pylori* adherence factor blood group antigen binding adhesin during chronic gastric inflammation. *Cancer Res.* **61**:1903-1909.
184. **Pugsley, A. P., O. Francetic, O. M. Possot, N. Sauvonnet, and K. R. Hardie.** 1997. Recent progress and future directions in studies of the main terminal branch of the general secretory pathway in Gram-negative bacteria--a review. *Gene* **192**:13-19.
185. **Puls, J., W. Fischer, and R. Haas.** 2002. Activation of *Helicobacter pylori* CagA by tyrosine phosphorylation is essential for dephosphorylation of host cell proteins in gastric epithelial cells. *Mol. Microbiol.* **43**:961-969.
186. **Rautemaa, R., H. Rautelin, P. Puolakkainen, A. Kokkola, P. Karkkainen, and S. Meri.** 2001. Survival of *Helicobacter pylori* From complement lysis by binding of GPI-anchored protectin (CD59). *Gastroenterology* **120**:470-479.
187. **Rektorschek, M., D. Weeks, G. Sachs, and K. Melchers.** 1998. Influence of pH on metabolism and urease activity of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* **115**:628-641.
188. **Ren, S., H. Higashi, H. Lu, T. Azuma, and M. Hatakeyama.** 2006. Structural basis and functional consequence of *Helicobacter pylori* CagA multimerization in cells. *J Biol. Chem.* **281**:32344-32352.
189. **Rieder, G., R. A. Hatz, A. P. Moran, A. Walz, M. Stolte, and G. Enders.** 1997. Role of adherence in interleukin-8 induction in *Helicobacter pylori*-associated gastritis. *Infect Immun.* **65**:3622-3630.
190. **Rohde, M., J. Puls, R. Buhrdorf, W. Fischer, and R. Haas.** 2003. A novel sheathed surface organelle of the *Helicobacter pylori* cag type IV secretion system. *Mol. Microbiol.* **49**:219-234.
191. **Romaniuk, P. J., B. Zoltowska, T. J. Trust, D. J. Lane, G. J. Olsen, N. R. Pace, and D. A. Stahl.** 1987. *Campylobacter pylori*, the spiral bacterium associated with human gastritis, is not a true *Campylobacter* sp. *J Bacteriol.* **169**:2137-2141.
192. **Rowland, M., D. Kumar, L. Daly, P. O'Connor, D. Vaughan, and B. Drumm.** 1999. Low rates of *Helicobacter pylori* reinfection in children. *Gastroenterology* **117**:336-341.

193. **Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, and H. A. Erlich.** 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**:487-491.
194. **Salama, N. R., G. Otto, L. Tompkins, and S. Falkow.** 2001. Vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori* plays a role during colonization in a mouse model of infection. *Infect Immun.* **69**:730-736.
195. **Sambrook, J.** 1989. Molecular Cloning - A Laboratory Manual, 2nd edition, *In* E. F. Fritsch and T. Maniatis (ed.), Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
196. **Sandkvist, M.** 2001. Biology of type II secretion. *Mol. Microbiol* **40**:271-283.
197. **Satin, B., N. Norais, J. Telford, R. Rappuoli, M. Murgia, C. Montecucco, and E. Papini.** 1997. Effect of *Helicobacter pylori* vacuolating toxin on maturation and extracellular release of procathepsin D and on epidermal growth factor degradation. *J. Biol. Chem.* **272**:25022-25028.
198. **Sauvonnet, N. and A. P. Pugsley.** 1996. Identification of two regions of *Klebsiella oxytoca* pullulanase that together are capable of promoting beta-lactamase secretion by the general secretory pathway. *Mol. Microbiol* **22**:1-7.
199. **Schechter, L. M., K. A. Roberts, Y. Jamir, J. R. Alfano, and A. Collmer.** 2004. *Pseudomonas syringae* type III secretion system targeting signals and novel effectors studied with a Cya translocation reporter. *J. Bacteriol.* **186**:543-555.
200. **Schmitt, W. and R. Haas.** 1994. Genetic analysis of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin: structural similarities with the IgA protease type of exported protein. *Mol. Microbiol.* **12**:307-319.
201. **Schnaitman, C. A.** 2007. Solubilization of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by Triton X-100. *J. Bacteriol.* **108**:545-552.
202. **Schrammeijer, B., A. den Dulk-Ras, A. C. Vergunst, J. E. Jurado, and P. J. Hooykaas.** 2003. Analysis of Vir protein translocation from *Agrobacterium tumefaciens* using *Saccharomyces cerevisiae* as a model: evidence for transport of a novel effector protein VirE3. *Nucleic Acids Res.* **31**:860-868.
203. **Schreiber, S., M. Konradt, C. Groll, P. Scheid, G. Hanauer, H. O. Werling, C. Josenhans, and S. Suerbaum.** 2004. The spatial orientation of *Helicobacter pylori* in the gastric mucus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **101**:5024-5029.
204. **Schreiber, S., M. Stuben, C. Josenhans, P. Scheid, and S. Suerbaum.** 1999. In vivo distribution of *Helicobacter felis* in the gastric mucus of the mouse: experimental method and results. *Infect Immun.* **67**:5151-5156.
205. **Schroder, G. and E. Lanka.** 2005. The mating pair formation system of conjugative plasmids-A versatile secretion machinery for transfer of proteins and DNA. *Plasmid* **54**:1-25.

206. **Schulein, R., P. Guye, T. A. Rhomberg, M. C. Schmid, G. Schroder, A. C. Vergunst, I. Carena, and C. Dehio.** 2005. A bipartite signal mediates the transfer of type IV secretion substrates of *Bartonella henselae* into human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S A* **102**:856-861.
207. **Segal, E. D.** 1997. Consequences of attachment of *Helicobacter pylori* to gastric cells. *Biomed. Pharmacother.* **51**:5-12.
208. **Segal, E. D., J. Cha, J. Lo, S. Falkow, and L. S. Tompkins.** 1999. Altered states: involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S A* **96**:14559-14564.
209. **Segal, G., M. Feldman, and T. Zusman.** 2005. The Icm/Dot type-IV secretion systems of *Legionella pneumophila* and *Coxiella burnetii*. *FEMS Microbiol Rev.* **29**:65-81.
210. **Selbach, M., S. Moese, C. R. Hauck, T. F. Meyer, and S. Backert.** 2002. Src is the kinase of the *Helicobacter pylori* CagA protein in vitro and in vivo. *J Biol. Chem.* **277**:6775-6778.
211. **Selbach, M., S. Moese, R. Hurwitz, C. R. Hauck, T. F. Meyer, and S. Backert.** 2003. The *Helicobacter pylori* CagA protein induces cortactin dephosphorylation and actin rearrangement by c-Src inactivation. *EMBO J* **22**:515-528.
212. **Seshadri, R. and J. Samuel.** 2005. Genome analysis of *Coxiella burnetii* species: insights into pathogenesis and evolution and implications for biodefense. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1063**:442-450.
213. **Sexton, J. A. and J. P. Vogel.** 2002. Type IVB secretion by intracellular pathogens. *Traffic.* **3**:178-185.
214. **Seydel, A., E. Tasca, D. Berti, R. Rappuoli, G. Del Giudice, and C. Montecucco.** 2002. Characterization and immunogenicity of the CagF protein of the cag pathogenicity island of *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* **70**:6468-6470.
215. **Shea, J. E., M. Hensel, C. Gleeson, and D. W. Holden.** 1996. Identification of a virulence locus encoding a second type III secretion system in *Salmonella typhimurium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**:2593-2597.
216. **Silhavy, T. J., S. A. Benson, and S. D. Emr.** 1983. Mechanisms of protein localization. *Microbiol Rev.* **47**:313-344.
217. **Skrzypek, E., C. Cowan, and S. C. Straley.** 1998. Targeting of the *Yersinia pestis* YopM protein into HeLa cells and intracellular trafficking to the nucleus. *Mol. Microbiol.* **30**:1051-1065.
218. **Skrzypek, E., T. Myers-Morales, S. W. Whiteheart, and S. C. Straley.** 2003. Application of a *Saccharomyces cerevisiae* model to study requirements for trafficking of *Yersinia pestis* YopM in eucaryotic cells. *Infect. Immun.* **71**:937-947.
219. **Sobala, G. M., J. E. Crabtree, M. F. Dixon, C. J. Schorah, J. D. Taylor, B. J. Rathbone, R. V. Heatley, and A. T. Axon.** 1991. Acute *Helicobacter pylori* infection: clinical features, local and systemic immune response, gastric mucosal histology, and gastric juice ascorbic acid concentrations. *Gut* **32**:1415-1418.

220. **Sory, M. P., A. Boland, I. Lambermont, and G. R. Cornelis.** 1995. Identification of the YopE and YopH domains required for secretion and internalization into the cytosol of macrophages, using the *cyaA* gene fusion approach. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **92**:11998-12002.
221. **Sory, M. P. and G. R. Cornelis.** 1994. Translocation of a hybrid YopE-adenylate cyclase from *Yersinia enterocolitica* into HeLa cells. *Mol. Microbiol* **14**:583-594.
222. **Sparks, J. W. and D. L. Brautigan.** 1986. Molecular basis for substrate specificity of protein kinases and phosphatases. *Int. J. Biochem.* **18**:497-504.
223. **Stebbins, C. E. and J. E. Galan.** 2001. Maintenance of an unfolded polypeptide by a cognate chaperone in bacterial type III secretion. *Nature* **414**:77-81.
224. **Stec, B., K. M. Holtz, C. L. Wojciechowski, and E. R. Kantrowitz.** 2005. Structure of the wild-type TEM-1 beta-lactamase at 1.55 Å and the mutant enzyme Ser70Ala at 2.1 Å suggest the mode of noncovalent catalysis for the mutant enzyme. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **61**:1072-1079.
225. **Stein, M., F. Bagnoli, R. Halenbeck, R. Rappuoli, W. J. Fantl, and A. Covacci.** 2002. c-Src/Lyn kinases activate *Helicobacter pylori* CagA through tyrosine phosphorylation of the EPIYA motifs. *Mol. Microbiol* **43**:971-980.
226. **Stone, M. A.** 1999. Transmission of *Helicobacter pylori*. *Postgrad. Med J* **75**:198-200.
227. **Suerbaum, S., C. Josenhans, and A. Labigne.** 1993. Cloning and genetic characterization of the *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* *flaB* flagellin genes and construction of *H. pylori* *flaA*- and *flaB*-negative mutants by electroporation-mediated allelic exchange. *J. Bacteriol.* **175**:3278-3288.
228. **Sundberg, C., L. Meek, K. Carroll, A. Das, and W. Ream.** 1996. VirE1 protein mediates export of the single-stranded DNA-binding protein VirE2 from *Agrobacterium tumefaciens* into plant cells. *J. Bacteriol.* **178**:1207-1212.
229. **Sundberg, C. D. and W. Ream.** 1999. The *Agrobacterium tumefaciens* chaperone-like protein, VirE1, interacts with VirE2 at domains required for single-stranded DNA binding and cooperative interaction. *J. Bacteriol.* **181**:6850-6855.
230. **Suzuki, M., H. Mimuro, T. Suzuki, M. Park, T. Yamamoto, and C. Sasakawa.** 2005. Interaction of CagA with Crk plays an important role in *Helicobacter pylori*-induced loss of gastric epithelial cell adhesion. *J. Exp. Med.* **202**:1235-1247.
231. **Taha, A. S., W. D. Fraser, R. W. Kelly, C. G. Gemmell, F. D. Lee, and R. I. Russell.** 1991. Inhibition of human gastric cyclic AMP production by *Helicobacter pylori* protein--possible involvement of mucosal prostaglandin E2. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **5**:379-389.
232. **Telford, J. L., P. Ghiara, M. Dell'Orco, M. Comanducci, D. Burroni, M. Bugnoli, M. F. Tecce, S. Censini, A. Covacci, Z. Xiang, and .** 1994. Gene structure of the *Helicobacter pylori* cytotoxin and evidence of its key role in gastric disease. *J. Exp. Med* **179**:1653-1658.
233. **Thanassi, D. G. and S. J. Hultgren.** 2000. Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**:420-430.

234. Thieme, F., R. Koebnik, T. Bekel, C. Berger, J. Boch, D. Buttner, C. Caldana, L. Gaigalat, A. Goesmann, S. Kay, O. Kirchner, C. Lanz, B. Linke, A. C. McHardy, F. Meyer, G. Mittenhuber, D. H. Nies, U. Niesbach-Klosgen, T. Patschkowski, C. Ruckert, O. Rupp, S. Schneiker, S. C. Schuster, F. J. Vorholter, E. Weber, A. Puhler, U. Bonas, D. Bartels, and O. Kaiser. 2005. Insights into genome plasticity and pathogenicity of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* revealed by the complete genome sequence. *J Bacteriol.* **187**:7254-7266.
235. Thompson, L. J., D. S. Merrell, B. A. Neilan, H. Mitchell, A. Lee, and S. Falkow. 2003. Gene expression profiling of *Helicobacter pylori* reveals a growth-phase-dependent switch in virulence gene expression. *Infect Immun.* **71**:2643-2655.
236. Tomb, J. F., O. White, A. R. Kerlavage, R. A. Clayton, G. G. Sutton, R. D. Fleischmann, K. A. Ketchum, H. P. Klenk, S. Gill, B. A. Dougherty, K. Nelson, J. Quackenbush, L. Zhou, E. F. Kirkness, S. Peterson, B. Loftus, D. Richardson, R. Dodson, H. G. Khalak, A. Glodek, K. McKenney, L. M. Fitzgerald, N. Lee, M. D. Adams, E. K. Hickey, D. E. Berg, J. D. Gocayne, T. R. Utterback, J. D. Peterson, J. M. Kelley, M. D. Cotton, J. M. Weidman, C. Fujii, C. Bowman, L. Watthey, E. Wallin, W. S. Hayes, M. Borodovsky, P. D. Karp, H. O. Smith, C. M. Fraser, and J. C. Venter. 1997. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* **388**:539-547.
237. Tsutsumi, R., A. Takahashi, T. Azuma, H. Higashi, and M. Hatakeyama. 2006. Focal adhesion kinase is a substrate and downstream effector of SHP-2 complexed with *Helicobacter pylori* CagA. *Mol. Cell Biol.* **26**:261-276.
238. Umehara, S., H. Higashi, N. Ohnishi, M. Asaka, and M. Hatakeyama. 2003. Effects of *Helicobacter pylori* CagA protein on the growth and survival of B lymphocytes, the origin of MALT lymphoma. *Oncogene* **22**:8337-8342.
239. van Amsterdam, K., A. H. van Vliet, J. G. Kusters, and E. A. van der. 2006. Of microbe and man: determinants of *Helicobacter pylori*-related diseases. *FEMS Microbiol Rev.* **30**:131-156.
240. Vergunst, A. C., B. Schrammeijer, A. den Dulk-Ras, C. M. de Vlaam, T. J. Regensburg-Tuink, and P. J. Hooykaas. 2000. VirB/D4-dependent protein translocation from *Agrobacterium* into plant cells. *Science* **290**:979-982.
241. Vergunst, A. C., M. C. van Lier, A. den Dulk-Ras, and P. J. Hooykaas. 2003. Recognition of the *Agrobacterium tumefaciens* VirE2 translocation signal by the VirB/D4 transport system does not require VirE1. *Plant Physiol* **133**:978-988.
242. Vergunst, A. C., M. C. van Lier, A. Dulk-Ras, T. A. Stuve, A. Ouwehand, and P. J. Hooykaas. 2005. Positive charge is an important feature of the C-terminal transport signal of the VirB/D4-translocated proteins of *Agrobacterium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S A* **102**:832-837.
243. Viala, J., C. Chaput, I. G. Boneca, A. Cardona, S. E. Girardin, A. P. Moran, R. Athman, S. Memet, M. R. Huerre, A. J. Coyle, P. S. DiStefano, P. J. Sansonetti, A. Labigne, J. Bertin, D. J. Philpott, and R. L. Ferrero. 2004. Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. *Nat. Immunol.* **5**:1166-1174.

244. **Vieth, M. and M. Stolte.** 2006. Elevated risk for gastric adenocarcinoma can be predicted from histomorphology. *World J. Gastroenterol.* **12**:6109-6114.
245. **Vincent, C. D. and J. P. Vogel.** 2006. The *Legionella pneumophila* IcmS-LvgA protein complex is important for Dot/Icm-dependent intracellular growth. *Mol. Microbiol* **61**:596-613.
246. **Vollmers, H. P., K. Stulle, J. Dammrich, M. Pfaff, T. Papadopoulos, C. Betz, K. Saal, and H. K. Muller-Hermelink.** 1993. Characterization of four new gastric cancer cell lines. *Virchows Arch. B Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.* **63**:335-343.
247. **Voulhoux, R., G. Ball, B. Ize, M. L. Vasil, A. Lazdunski, L. F. Wu, and A. Filloux.** 2001. Involvement of the twin-arginine translocation system in protein secretion via the type II pathway. *EMBO J* **20**:6735-6741.
248. **Voulhoux, R., M. P. Taupiac, M. Czjzek, B. Beaumelle, and A. Filloux.** 2000. Influence of deletions within domain II of exotoxin A on its extracellular secretion from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* **182**:4051-4058.
249. **Walker, M. M. and M. F. Dixon.** 1996. Gastric metaplasia: its role in duodenal ulceration. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **10 Suppl 1**:119-128.
250. **Ward, D. V., J. R. Zupan, and P. C. Zambryski.** 2002. *Agrobacterium* VirE2 gets the VIP1 treatment in plant nuclear import. *Trends Plant Sci.* **7**:1-3.
251. **Warren, J. R. and B. J. Marshall.** 1983. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* **1**:1273-1275.
252. **Wattiau, P., S. Woestyn, and G. R. Cornelis.** 1996. Customized secretion chaperones in pathogenic bacteria. *Mol. Microbiol* **20**:255-262.
253. **Weeks, D. L., S. Eskandari, D. R. Scott, and G. Sachs.** 2000. A H<sup>+</sup>-gated urea channel: the link between *Helicobacter pylori* urease and gastric colonization. *Science* **287**:482-485.
254. **Winans, S. C., D. L. Burns, and P. J. Christie.** 1996. Adaptation of a conjugal transfer system for the export of pathogenic macromolecules. *Trends Microbiol.* **4**:64-68.
255. **Worku, M. L., R. L. Sidebotham, J. H. Baron, J. J. Misiewicz, R. P. Logan, T. Keshavarz, and Q. N. Karim.** 1999. Motility of *Helicobacter pylori* in a viscous environment. *Eur J Gastroenterol Hepatol* **11**:1143-1150.
256. **Wotherspoon, A. C.** 1998. Gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue and *Helicobacter pylori*. *Annu. Rev. Med* **49**:289-299.
257. **Wulff-Strobel, C. R., A. W. Williams, and S. C. Straley.** 2002. LcrQ and SycH function together at the Ysc type III secretion system in *Yersinia pestis* to impose a hierarchy of secretion. *Mol. Microbiol.* **43**:411-423.
258. **Wyatt, J. I., B. J. Rathbone, G. M. Sobala, T. Shallcross, R. V. Heatley, A. T. Axon, and M. F. Dixon.** 1990. Gastric epithelium in the duodenum: its association with *Helicobacter pylori* and inflammation. *J Clin Pathol.* **43**:981-986.



259. **Xiang, Z., S. Censini, P. F. Bayeli, J. L. Telford, N. Figura, R. Rappuoli, and A. Covacci.** 1995. Analysis of expression of CagA and VacA virulence factors in 43 strains of *Helicobacter pylori* reveals that clinical isolates can be divided into two major types and that CagA is not necessary for expression of the vacuolating cytotoxin. *Infect Immun.* **63**:94-98.
260. **Yahr, T. L., A. J. Vallis, M. K. Hancock, J. T. Barbieri, and D. W. Frank.** 1998. ExoY, an adenylate cyclase secreted by the *Pseudomonas aeruginosa* type III system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**:13899-13904.
261. **Yamaoka, Y., M. Kita, T. Kodama, N. Sawai, K. Kashima, and J. Imanishi.** 1997. Induction of various cytokines and development of severe mucosal inflammation by cagA gene positive *Helicobacter pylori* strains. *Gut* **41**:442-451.
262. **Yamaoka, Y., D. H. Kwon, and D. Y. Graham.** 2000. A M(r) 34,000 proinflammatory outer membrane protein (oipA) of *Helicobacter pylori*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**:7533-7538.
263. **Yang, F., L. G. Moss, and G. N. Phillips, Jr.** 1996. The molecular structure of green fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* **14**:1246-1251.
264. **Yokoyama, K., H. Higashi, S. Ishikawa, Y. Fujii, S. Kondo, H. Kato, T. Azuma, A. Wada, T. Hirayama, H. Aburatani, and M. Hatakeyama.** 2005. Functional antagonism between *Helicobacter pylori* CagA and vacuolating toxin VacA in control of the NFAT signaling pathway in gastric epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**:9661-9666.
265. **Zhao, Z., E. Sagulenko, Z. Ding, and P. J. Christie.** 2001. Activities of virE1 and the VirE1 secretion chaperone in export of the multifunctional VirE2 effector via an *Agrobacterium* type IV secretion pathway. *J Bacteriol.* **183**:3855-3865.
266. **Zlokarnik, G., P. A. Negulescu, T. E. Knapp, L. Mere, N. Burres, L. Feng, M. Whitney, K. Roemer, and R. Y. Tsien.** 1998. Quantitation of transcription and clonal selection of single living cells with beta-lactamase as reporter. *Science* **279**:84-88.
267. **Zupan, J., T. R. Muth, O. Draper, and P. Zambryski.** 2000. The transfer of DNA from *agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. *Plant J* **23**:11-28.

## VIII Abkürzungen








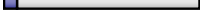
$\alpha$ -	anti-
$\mu$	mikro ( $10^{-6}$ )
Abb.	Abbildung
Amp (Amp <sup>R</sup> )	Ampicillin (Ampicillinresistenz)
AP	Alkalische Phosphatase
AA	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Brom-3-chlor-3-indolylphosphat-p-toluidinsalz
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CagA	Cytotoxin-assoziiertes Antigen A
Cam	Chloramphenicol
CM	cytoplasmatische (innere) Membran gramnegativer Bakterien
C-Terminus	carboxyterminaler Teil eines Proteins
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
<i>et al.</i>	et alteri
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EtOH	Ethanol
FCS	Fetales Kälberserum
g	Gramm
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GST	Glutathion S-Transferase
h	hora, Stunde
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kDa	Kilo-Dalton

---



























Kam	Kanamycin
l	Liter
Lsg.	Lösung
m	milli ( $10^{-3}$ ), Meter
M	Molar
max.	maximal
MALT	<i>mucosa-associated lymphoid tissue</i>
MetOH	Methanol
min	Minute
ml	Milliliter
MOI	<i>multiplicity of infection</i> ; Anzahl der Bakterien pro Wirtszelle
Mpf	<i>mating pair formation</i> -Komplex
nm	nano ( $10^{-9}$ )
N-Terminus	aminoterminaler Teil eines Proteins
OD <sub>x</sub>	Optische Dichte, gemessen bei einer Wellenlänge von x nm
OM	äußere Membran gramnegativer Bakterien
<i>orf</i>	<i>open reading frame</i> , offener Leserahmen
p. a.	pro analysis
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAI	Pathogenitätsinsel
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
p	pico ( $10^{-12}$ )
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POX	Meerrettichperoxidase
P-Tyr	Phosphotyrosin
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s, sec.	Sekunde
Std.	Stunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SHP-2	Tyrosinphosphatase mit SH2 (Src Homologieregion 2)-Domäne
Strep	Streptomycin
T3S	Typ III-Sekretion
T3SS	Typ III-Sekretionssystem(e)
T4S	Typ IV-Sekretion
T4SS	Typ IV-Sekretionssystem(e)
Tab.	Tabelle
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen / Volumen
VacA	vakuolisierendes Cytotoxin A
W	Watt
wt	<i>wild type</i> , Wildtyp
w/v	Masse / Volumen
Yop	<i>Yersinia outer protein</i>

## IX Anhang

### 1 Schematische Darstellung der GSK-Fusionsproteine

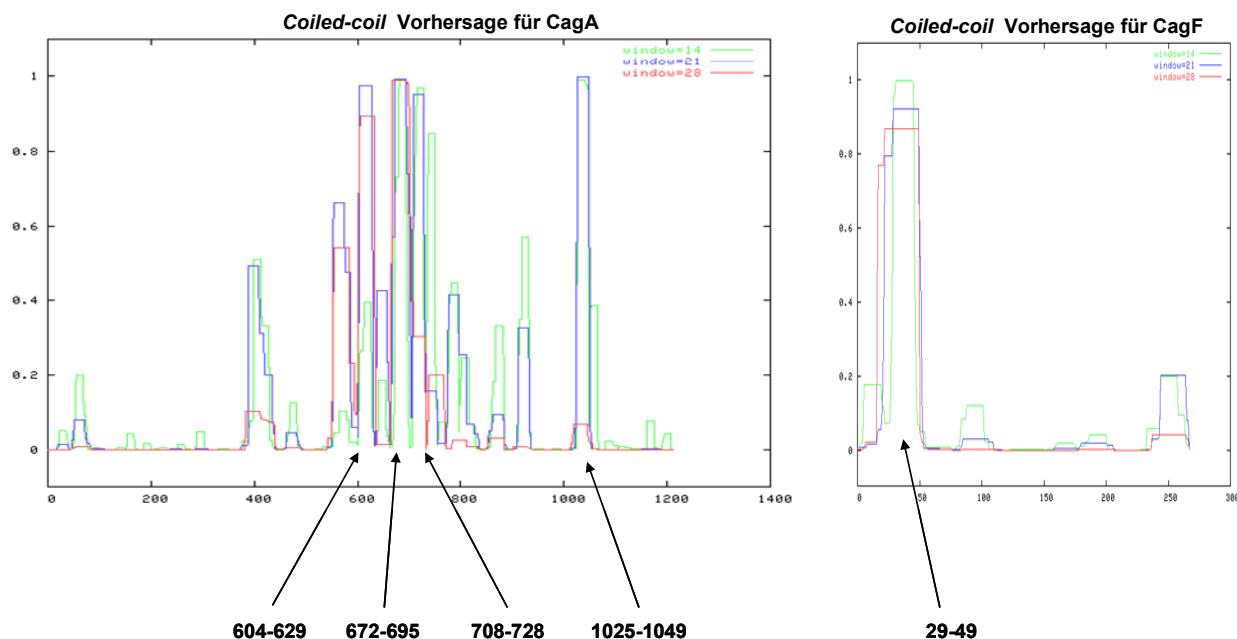
	Expression	Phosph.	IVP
 GSK-Cag $\zeta$ (pIP24)	+	-	+
 GSK-Cag $\zeta$ (pIP57, P $\zeta$ )	+	-	nd
 Cag $\zeta$ -GSK (pIP56, P $\zeta$ )	+	-	nd
 GSK-Cag $\epsilon$ (pIP28)	+	-	+
 GSK-CagS (pIP14)	+	-	+
 GSK-CagP (pIP27)	-	nd	nd
 GSK-CagQ (pIP25)	o	-	nd
 GSK-CagF (pIP15)	+	-	+

**Abb. 43:** Dargestellt sind alle in dieser Arbeit beschriebenen Fusionen des GSK-Tags mit PAI-Proteinen, außer CagA. Alle Konstrukte basieren auf dem GSK-Expressionsvektor (vgl. Abb. 9). Relevante Eigenschaften sowie zur Herstellung verwendete Oligonukleotide sind in den Tabellen 4 und 5 beschrieben. Expression: Konstrukte werden in *H. pylori* exprimiert, Phosph.: GSK-Phosphorylierung nach AGS-Zell-Infektionen, IVP: *in vitro*-Phosphorylierung mit Zelllysaten, +: normal, -: negativ, o: schwach, nd: nicht getestet.

		Expression	Phosph.	IVP
	GSK-CagA (aa1-1214) (pIP9)	+	+	+
	GSK-CagAΔ39N (pIP17)	o	-	+
	GSK-CagAΔ351N (pIP23)	+	-	nd
	GSK-CagAΔ613N (pWS231)	+	-	+
	GSK-CagAΔ1019N (pIP8)	+	-	+
	GSK-CagAΔ1164N (pWS272)	-	nd	nd
	GSK-CagA (aa1-1209) (pWS251)	+	+	+
	GSK-CagA (aa1-1207) (pWS253)	+	o	+
	GSK-CagA (aa1-1202) (pIP35)	+	-	+
	GSK-CagA (aa1-1195) (pWS252)	+	-	nd
	CagA (aa1-1123) (pWS179-13)	+	-	+
	GSK-CagA (aa1-868) (pWS274)	+	-	nd
	GSK-CagA (aa1-703) (pIP9-2)	+	-	nd
	CagA (aa1-605)-GSK (pIP22)	+	-	+
	GSK-CagA (aa614-951) (pWS271)	+	nd	nd
	GSK-CagA (aa847-1033) (pIP48)	+	nd	nd
	GSK-CagAΔ58-587 (pIP29)	+	-	+
	GSK-CagAΔ614-1019 (pIP30)	+	-	+
	GSK-CagAΔ695-1019 (pRL5)	+	+	nd
	GSK-CagAΔ783-1019 (pRL6)	+	+	nd
	GSK-CagAΔ868-1019 (pWS269)	+	+	nd
	GSK-CagAΔ952-1019 (pWS270)	+	+	nd
	GSK-CagA <sub>P12/11637</sub> (pWS266)	+	+	nd
	GSK-CagA <sub>P12/11637</sub> (pWS268)	+	+	nd
	GSK-CagA <sub>P12/11637</sub> (pWS267)	+	+	nd
	GSK-CagA <sub>P12/11637</sub> (pWS265)	+	+	nd

**Abb. 44: Dargestellt sind alle in dieser Arbeit beschriebenen GSK-CagA-Fusionsproteine.** Alle Konstrukte basieren auf dem GSK-Expressionsvektor (vgl. Abb. 9). Relevante Eigenschaften sowie zur Herstellung verwendete Oligonukleotide sind in den Tabellen 4 und 5 beschrieben. Expression: Konstrukte werden in *H. pylori* exprimiert, Phosph.: GSK-Phosphorylierung nach AGS-Zell-Infektionen, IVP: *in vitro*-Phosphorylierung mit Zelllysaten, +: normal, -: negativ, o: schwach, nd: nicht getestet.

## 2 Sekundärstrukturvorhersagen



**Abb. 45:** *Coiled-coil* Vorhersagen für CagA und CagF mit COILS (5). Die markierten Aminosäurebereiche der Proteine CagA und CagF zeichnen sich höchstwahrscheinlich durch eine *coiled-coil* Struktur aus. Dieses Strukturmerkmal ist charakteristisch für Chaperon-Binde-Domänen in T3SS und häufiges Merkmal von Protein-Protein-Interaktionsbereichen. Auf der X-Achse sind die Aminosäuren aufgetragen, auf der Y-Achse die Wahrscheinlichkeit für eine *coiled-coil* Struktur.

AA	1019	1123
OrigSeq	: 1-----11-----21-----31-----41-----51-----61-----71-----81-----91-----101-- :	
	: EDLSKVGLSRNQKLAQKIDNLNQAVSEAKAGFFGNLEQTIDKLDSTKYNFVNLWVESAKKVPASLSAKLDNYATNSHTRINSNIKNGAINEKATGMLAQKNPEW :	
jalign	: ---E---HHHHHHHH---HEHHHH---HHHHHH---HE-EHHH---HHH---HH--- :	
jfreq	: -----HHHHHHHH---HHHHHHHH---HHHHHH---EEEEEE---H---EEE---EE-HHH-HHEE--- :	
jhm	: -----HHHHHHHH---HHHHHHHH---HHHHHH---HHHHHHHHHH---HHHHHH---H---HH---EEEE--- :	
jnet	: -----HHHHHHHH---HHHHHHHH---HHHHHH---EEEEEE---E---HHHH---E---EE--- :	
jpssm	: -----HHHHHHHH---HHHHHH---HHHHHH---EEEEEE---E-E---HHHH---E---EE--- :	
jpred	: -----HHHHHHHH---HHHHHHHH---HHHHHH---EEEEEE---E---HHHH---E---EE--- :	

**Abb. 46:** Die Chaperon-Binde-Domäne auf dem CagA-Molekül. Sequenz und Sekundärstrukturvorhersagen mit JPred (<http://jpred.ebi.ac.uk/>). Die unterste Zeile gibt die Konsensus-Vorhersage aller verwendeten Methoden wieder.

## **An dieser Stelle gilt mein herzlicher Dank:**

Herrn Prof. Dr. Anton Hartmann für die unkomplizierte Übernahme der Vertretung meiner Arbeit vor der Fakultät für Biologie.

Herrn Prof. Dr. Heinrich Jung für die Korrektur und die Erstellung des Zweitgutachtens.

Herrn Prof. Dr. Rainer Haas für die herzliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und seine stete Diskussionsbereitschaft.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei PD Dr. Wolfgang Fischer für die hervorragende Betreuung, sein Interesse am Fortgang dieser Arbeit und seine Unterstützung und Motivation bei neuen Ideen. Die gemeinsame Forschung und so manche Ruderpartie haben viel Spaß gemacht!

Bedanken möchte ich mich natürlich bei allen „Haasen“ für das gute Arbeitsklima im Labor in den letzten drei Jahren! Danke Luisa, für Dein stetes Interesse an meinem Befinden, die kleinen Aufmunterungen zwischendurch und produktive Diskussionen über unsere „Ergebnisse“. Evelyn für ihre Hilfe und für viel Spaß in unserem U! Auch Claudia, die mir in der Anfangszeit sehr geholfen hat mich einzuleben, Xaver für seine unerschütterliche Hilfsbereitschaft und einmalige Touren, Sandra, Herbert sowie Daniela für die Unterstützung bei einigen Kochpreps und Expressionsversuchen. Allen Freitagsstammtischlern – es war immer wieder ein schöner Wochenausklang! Meiner Masterstudentin Romy und natürlich allen übrigen Mitgliedern unserer AG: Friederike, Stefan O und Stefan K, Arno, Kirstin, Heide, Michaela, Sarah, Tina, Iris, Steffi, Tobias, Gabi und vielen Praktikanten.

Ganz lieben Dank auch allen Freunden, die ich in letzter Zeit doch ganz schön vernachlässigt habe, für Eure Aufmunterungen und viele vergnügliche Stunden. Auch meinen Klettergenossen, Felix und den Freisingern, die mich nach einem Labortag immer ganz schnell auf andere Gedanken gebracht haben!

Ganz besonders auch Sabine für die langen Telefonate nach *down under* bzw. auf die Insel, diverse Telefonbiere und morgendliche *pre-lab* Bergtouren. War super!

Meinen Eltern, Geschwistern und Nichten, die mein Leben sehr bereichern und mir immer und in jeder Lebenslage Halt gegeben haben. In Zukunft werde ich wieder mehr Zeit für Euch haben!

Und natürlich ganz besonders meinem Freund Jürgen. Vielen Dank für die kritische Durchsicht des Manuskripts dieser Arbeit, das geduldige Ertragen meiner Launen, Deine Unterstützung in jeder Hinsicht und die vielen gemeinsam erklommenen Höhen!

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Isabelle Maria Pattis  
geboren am 03.05.1976 in St. Johann/Tirol

## Promotion

09/03 – 03/07      Anfertigung der vorliegenden Dissertation  
„Molekulare Mechanismen der Erkennung des CagA-Proteins als  
Substrat für das Cag-Typ IV-Sekretionssystem in *Helicobacter pylori*“  
  
bei Prof. Dr. Rainer Haas und PD Dr. Wolfgang Fischer, Max-von-  
Pettenkofer Institut, Ludwig-Maximilians-Universität München

## Studium

11/96 – 10/02      Studium der Biologie, Ludwig-Maximilians-Universität München  
Hauptfach Mikrobiologie  
Nebenfächer Immunologie, Biochemie, Ökologie  
  
Diplomarbeit: „Einfluss einer H<sub>2</sub>-Behandlung auf die Bodenmikroflora  
und die molekulare Diversität der *cbbL*- (RuBisCO) Gene“  
bei Prof. Dr. Anton Hartmann, Institut für Bodenökologie, GSF-  
Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, Neuherberg  
Abschluss: Diplom

## Berufsausbildung

09/92 – 07/94      Ausbildung zur Technischen Assistentin  
Fachrichtung Milchwirtschaft und Lebensmittelanalytik  
Fachakademie für Landwirtschaft, Landsberg/Lech  
Abschluss: Staatl. Geprüfte LTA

## Schulausbildung

09/82 – 07/88      Grund- und Hauptschule Dachau Süd  
09/88 – 07/92      Realschule Markt Indersdorf, Abschluss: Mittlere Reife  
09/94 – 07/96      Berufsoberschule (BOS) in München  
Abschluss: Fachgebundene Hochschulreife